



Oscar Herreras Espinosa, Doctor en Ciencias e Investigador Científico del Instituto Cajal – CSIC

CERTIFICA:

Que Don Gonzalo Martín Vázquez ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Neurociencia Funcional y de Sistemas del Instituto Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Madrid el trabajo correspondiente a su tesis Doctoral titulada *“Identificación de las subpoblaciones neuronales aferentes responsables del EEG hipocámpico mediante descomposición ciega de fuentes”*, para alcanzar el grado de Doctor, y queda conforme con su presentación para que sea juzgada.

Y para que así conste, firmo el presente en Madrid, a 1 de Abril de dos mil dieciséis.

Fdo.: Oscar Herreras Espinosa

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Instituto Nicolás Cabrera



**IDENTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES NEURONALES
AFERENTES RESPONSABLES DEL EEG HIPOCÁMPICO
MEDIANTE DESCOMPOSICIÓN CIEGA DE FUENTES**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por:

Gonzalo Martín Vázquez

Dirigida por:

Óscar Herreras Espinosa

Madrid, 2016



Ala tati Pilar

IDENTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES NEURONALES AFERENTES RESPONSABLES DEL EEG HIPOCÁMPICO MEDIANTE DESCOMPOSICIÓN CIEGA DE FUENTES

Resumen

El estudio de la actividad del Sistema Nervioso requiere una elección adecuada de las variables que reflejen el procesamiento de la información contenida en los distintos estímulos que recibe. Quizás, la variable más idónea, por su precisión temporal y espacial, sea la señal eléctrica denominada potencial de campo local o LFP (por sus siglas en inglés: *Local field potential*). El LFP refleja la actividad instantánea de las distintas poblaciones neuronales, permitiendo así la monitorización de complejos procesos computacionales entre distintas áreas del cerebro. No obstante, la propia naturaleza mixta del LFP hace su estudio realmente arduo. Además, existen otros aspectos que dificultan su interpretación, relacionados con la falta de una línea base en las fluctuaciones de la señal eléctrica registrada y con diversos factores locales por los que una misma población produce distintos LFPs en diferentes regiones diana. Buena parte de esta Memoria persigue, de hecho, solventar algunas de estas dificultades y permitir una interpretación biofísica rigurosa del LFP.

Nos hemos centrado fundamentalmente en la actividad de la región de CA3 del hipocampo, incluyendo sus conexiones con diversas estructuras. Los objetivos principales fueron (1) el desarrollo de un método para recuperar la línea base de oscilaciones del LFP y determinar su polaridad real, (2) el estudio de los factores implicados en la diversidad de LFPs generados por CA3 en distintas regiones y, (3) por último, el estudio del funcionamiento del circuito CA3-CA1 como estructura bilateral.

Para ello hemos realizado registros eléctricos intracerebrales en ratas anestesiadas por un lado, y en paralelo, hemos realizado modelos matemáticos que simulan la generación de LFPs en distintas poblaciones neuronales. Para extraer la actividad específica de las distintas aferencias de CA3 a sus regiones diana aplicamos una técnica de separación ciega de fuentes denominada análisis de componentes independientes. Además, combinamos los análisis con la inyección local de determinados fármacos, lo que nos permitió manipular la actividad específica de determinadas poblaciones neuronales.

El desarrollo de un método apropiado (consistente en el uso combinado de fármacos y análisis de componentes independientes) para determinar la línea base de oscilaciones del LFP nos ha permitido estudiar el LFP específico generado por CA3 en distintas regiones. Hemos observado que la aferencia sináptica contralateral de CA3 a las células piramidales de CA1 produce un LFP despreciable, siendo mayoritaria la contribución de la aferencia ipsilateral. El caso del LFP producido en el Septum Lateral también tiene una amplitud mínima. También hemos observado que el LFP de CA1 producido por la entrada de CA3 se ve afectado por conducción por volumen desde otras regiones así como por la coactivación de interneuronas locales. Por último, y como aplicación funcional, hemos determinado que las células piramidales de CA1 disparan preferentemente cuando la actividad de las regiones de CA3 de ambos hemisferios es sincrónica y que dicha sincronía es dependiente de la conexión interhemisférica a través de la comisura ventral hipocámpal.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Aspectos generales	13
1.2 Origen eléctrico del potencial de campo local	14
1.3 Importancia de la línea base en los registros electrofisiológicos	22
1.4 Otros factores que influyen en la generación del LFP	28
1.4.1 Conducción por volumen	28
1.4.2 Citoarquitectura	28
1.5 Objetivos	32
2. MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1 Procedimiento experimental	33
2.1.1 Cirugía	33
2.1.2 Estimulación y registro	34
2.1.3 Aplicación local de fármacos	34
2.1.4 Histología	35
2.2 Simulación de LFPs espontáneos	35
2.2.1 Simulación de las entradas sinápticas	36
2.2.1.1 Entrada excitadora (Schaffer) e inhibidora (perisomática y apical distal) a las células piramidales de CA1	36
2.2.1.2 Entradas excitadoras ipsilaterales (Schaffer) y contralaterales (comisurales) a las células piramidales de CA1	37
2.2.1.3 Entradas excitadoras ipsilaterales a las células de tipo interneurona en el LS	37
2.2.2 Modelo celular	37
2.2.2.1 Célula piramidal de la región de CA1	37
2.2.2.2 Entradas excitadoras ipsilaterales (Schaffer) y contralaterales (comisurales) a las células piramidales de CA1	39
2.2.2.3 Célula piramidal de la región de CA3	39
2.2.2.4 Célula tipo interneurona del LS	39
2.2.2.5 Célula de morfología no realista	40
2.2.3 Modelo del agregado neuronal	40
2.2.3.1 Células piramidales de CA1	40
2.2.3.2 Modelo del Septum Lateral	40

2.2.4 Cálculo del LFP	40
2.3 Análisis de datos	41
2.3.1 Análisis de componentes independientes (ICA)	41
2.3.2 Análisis de fuentes de corrientes (CSD).....	43
2.3.3 Extracción y clasificación de espigas de neuronas individuales.....	43
2.3.4 Detección de eventos sinápticos poblacionales en el LFP.....	44
2.3.5 Coherencia espectral	45
2.3.6 Análisis de fase (PLV)	45
2.3.7 Potencia	46
2.3.8 Sincronización de eventos bilaterales de Schaffer y el disparo de neurona	46
3. RESULTADOS	49
3.1 Determinación de una línea base en las oscilaciones del LFP.....	49
3.1.1 El CSD de un perfil de LFP específico de vía exhibe dominios espaciales estables	54
3.1.2 Identificación del dominio sináptico	54
3.1.3 Rectificación de las corrientes sinápticas	56
3.1.4 Clasificación pre- o postsináptica de neuronas con respecto al LFP	58
3.2 Una entrada común desde CA3 produce LFPs diversos en distintas estructuras diana	60
3.2.1 Estudio de los potenciales provocados en distintas regiones tras la estimulación eléctrica de la región de CA3	60
3.2.2 La actividad espontánea de CA3 produce LFPs de distinta amplitud en diferentes regiones diana	62
3.2.3 La morfología y distribución de las neuronas en diferentes regiones explica las escalas de amplitud del LFP	66
3.2.4 La inactivación temporal de la región CA3 contralateral no revela la existencia de una contribución al LFP de CA1	69
3.2.5 Importancia de la sincronización de la entrada sináptica: los eventos excitadores gamma espontáneos provocados por entrada desde CA3 sólo son visibles en la CA1 ipsilateral	71
3.2.6 La dominancia de las dendritas apicales de CA1 en la producción de LFPs favorece la entrada ipsilateral y ocluye la contralateral	73
3.2.7 La simultaneidad de corrientes oscilatorias gamma en regiones cercanas modifica el perfil local del LFP de CA1	76
3.2.8 La co-activación de inhibiciones somáticas contribuye a las diferencias existentes entre potenciales espontáneos y provocados ipsi- y contralaterales	77
3.2.9 La excitación recurrente CA3-CA3 produce LFP	79
3.2.10 La dinámica de la entrada ipsilateral CA3-CA1 revela la existencia de un acoplamiento funcional entre los circuitos de CA3 de ambos hemisferios	82

4. DISCUSIÓN	87
4.1 Determinación de una línea base en las oscilaciones del LFP	87
4.2 Determinantes locales de los LFPs	91
5. CONCLUSIONES	97
6. BIBLIOGRAFÍA	99
AGRADECIMIENTOS	113
APÉNDICE A: ABREVIATURAS	115
APÉNDICE B: ARTÍCULOS PUBLICADOS	117
- Determining the true polarity and amplitude of synaptic currents underlying gamma oscillations of local field potentials	
- Diversity of LFPs activated in different target regions by a common CA3 input	

*“¿Tan insensatos sois? Habiendo
comenzado en Espíritu, ¿ahora
acabáis en carne?”*

Gálatas 3.3

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS GENERALES

El Sistema Nervioso recibe estímulos provenientes tanto del propio organismo como del exterior a través de distintos órganos sensoriales. Estos estímulos, de naturaleza físico-química, son transducidos, integrados y procesados en distintos núcleos nerviosos para posteriormente coordinar la ejecución de respuestas específicas, como la secreción de una hormona o el movimiento de un músculo. El Sistema Nervioso ha evolucionado en el Reino Animal adquiriendo una precisión temporal exquisita para explorar el medio y responder a las novedades que ocurren en él. Por tanto, el estudio de la función nerviosa requiere igualmente de técnicas con una sensibilidad temporal apropiada que permitan monitorizar el procesamiento de la información contenida en dichos estímulos.

De entre los distintos tipos de células que existen en el cerebro, son las neuronas quienes le dotan de su extraordinaria complejidad. Es, de hecho, la comunicación entre estas células por sinapsis eléctricas o mediante la liberación de neurotransmisores en las sinapsis químicas, quien hace posible la riqueza computacional que le caracteriza. Los distintos tipos de neuronas transmiten su información a lo largo de su anatomía mediante pulsos eléctricos o potenciales de acción, que se desplazan sin decremento gracias a la excitabilidad eléctrica de sus membranas.

Sería posible estudiar el funcionamiento de un Sistema Nervioso sencillo registrando la actividad de todas sus unidades de forma simultánea; sin embargo, en Vertebrados, el número de neuronas es demasiado elevado (en humanos se estima que el cerebro alberga alrededor de 10^{11} neuronas). Aunque una neurona puede ser estudiada individualmente de forma exhaustiva, la función cerebral involucra, en cada instante, y en distintas regiones, a una proporción considerable de ellas. Es evidente que las limitaciones técnicas impiden el registro simultáneo de todas las neuronas y, por tanto, la monitorización queda restringida a un subgrupo más o menos reducido.

Además de la señal eléctrica generada por los potenciales de acción, las sinapsis (que en su inmensa mayoría son de transmisión química) también generan otra fácilmente medible denominada potencial postsináptico o PSP (por sus siglas en inglés: *Postsynaptic Potential*), producido por el flujo de corriente a través de canales ligados a receptores en la membrana

subsináptica y que puede tener un carácter excitador o inhibitorio dependiendo de las especies iónicas que fluyen a su través. Aunque los PSPs pueden ser medidos también en neuronas individuales mediante registros intracelulares, su tamaño unitario es demasiado reducido como para ser captado en el espacio extracelular. Sin embargo, las sinapsis a menudo se activan de manera sincrónica en gran número de células, y sus corrientes se suman y mezclan en el espacio extracelular generando, contra la resistencia eléctrica del medio, una señal de potencial eléctrico compuesta y compleja. Esta mezcla de PSPs, junto con otras contribuciones menores de origen no sináptico, puede ser registrada incluso fuera del cerebro mediante electrodos en contacto con la piel: es lo que denominamos comúnmente como electroencefalograma (EEG). Tradicionalmente, cuando el registro del EEG es intracerebral, la señal se denomina potencial de campo local o LFP (por sus siglas en inglés: *Local Field Potential*). El LFP representa, pues, una señal en la que contribuyen distintas poblaciones neuronales de diversas áreas del cerebro y que puede ser monitorizada con una alta resolución espacial y temporal. Debido a su origen múltiple y a la enorme complejidad espacial de las fuentes de corriente, su estudio no está exento de dificultades que complican considerablemente la interpretación. De hecho, el menosprecio por la importancia de algunas dificultades técnicas de difícil solución ha llegado a cristalizar en interpretaciones simplistas que encierran un considerable error. Buena parte de esta Memoria describe el trabajo realizado para solventar algunas de estas dificultades y permitir una interpretación biofísica rigurosa de las mismas en base a su origen celular.

1.2 ORIGEN ELÉCTRICO DEL POTENCIAL DE CAMPO LOCAL

Un LFP tiene su origen en las corrientes transmembrana que se producen durante activación de sinapsis químicas (Fig. 1). Cuando un potencial de acción propagado por el axón de la neurona aferente llega al botón presináptico se produce una liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica que al contactar con receptores de la célula postsináptica provocan la apertura de canales iónicos, permitiendo el paso de corriente a través de la membrana. En el equilibrio electroquímico, la membrana tiene una diferencia de potencial de -65 mV del interior con respecto al exterior de la célula. En el caso de una sinapsis excitadora, la apertura de canales iónicos aumentará la permeabilidad de iones positivos, que tenderán a entrar en la célula debido al gradiente electroquímico favorable. Esta entrada de iones positivos provoca un cambio en el potencial de membrana denominado potencial postsináptico excitador o EPSP (por sus siglas en inglés: *Excitatory Postsynaptic Potential*), que llevará el potencial de membrana a valores menos negativos (despolarización) y se acercará al umbral de descarga de un potencial de acción. Este flujo de iones positivos supone una entrada de corriente en la célula que fluirá por

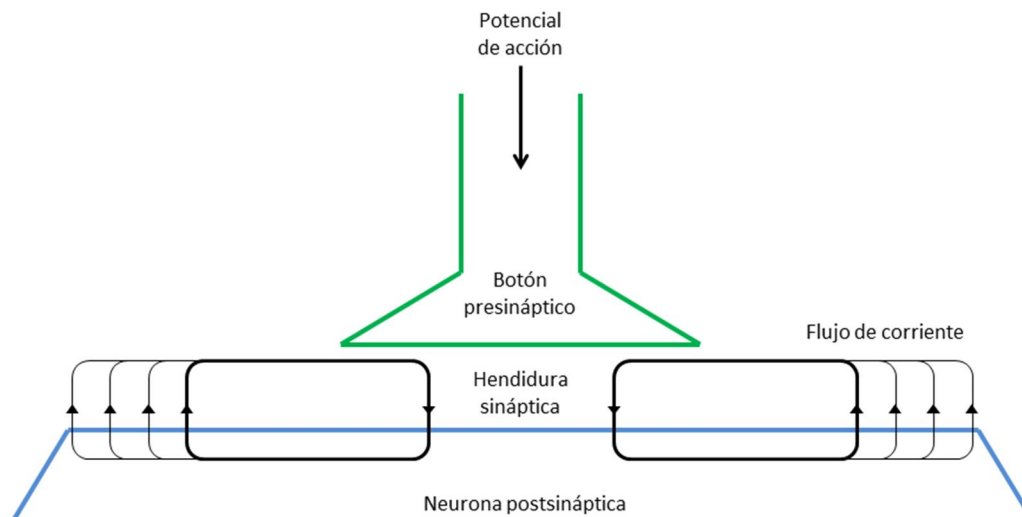


Figura 1. Corrientes de membrana producidas por una sinapsis química excitadora. El potencial de acción se propaga por el axón hasta llegar al botón presináptico donde produce la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica. Éstos, al unirse a determinados receptores de la membrana postsináptica modificarán la conductancia de forma selectiva a determinadas especies iónicas, produciéndose un flujo de corriente local (denominado sumidero o fuente dependiendo de si es hacia el interior o al exterior, respectivamente) que se continúa con un flujo inverso en puntos más distantes.

el espacio intracelular y saldrá al espacio extracelular por distintos puntos de su morfología en zonas tanto adyacentes como alejadas de la propia sinapsis, cerrando así bucles de corriente para mantener el principio de conservación de carga. Así, la corriente total que sale es igual a la que entra y la carga neta se conserva en cada instante de tiempo. Se dice que la corriente que sale de la célula por otros puntos de la membrana lo hace de forma pasiva, bien a través de canales que pudieran estar abiertos por otras acciones (cortocircuito o *shunt*), bien de forma capacitiva, actuando como un condensador gracias a las propiedades polares de los fosfolípidos que la componen. Desde el punto de vista del espacio extracelular, el sentido de las corrientes será el inverso, y así, en la propia sinapsis se producirá una salida de corriente (sumidero) y en las zonas más alejadas una entrada de corriente (fuente). En el caso de una sinapsis inhibitoria, el cambio en el potencial de membrana se denomina potencial postsináptico inhibitorio o IPSP (por sus siglas en inglés: *Inhibitory Postsynaptic Potential*) y tiene el efecto opuesto, es decir, lleva el potencial de membrana a valores más negativos alejándolo del umbral del potencial de acción. El flujo de corrientes asociados a un IPSP es idéntico al de un EPSP pero en sentido opuesto.

El esquema anterior corresponde a una sola sinapsis, pero se puede obtener una idea de la complejidad geométrica de las fuentes de corriente si tenemos en cuenta que cada una provocará flujos de corriente a través de toda la superficie celular y con una configuración espacial diferente. Si tenemos en cuenta la enorme variedad de posibles combinaciones de sinapsis

coactivadas en cada neurona en diferentes instantes, llegamos a una imagen extraordinariamente dinámica en la que cada neurona puede actuar como un incontable número de posibles fuentes de corriente de geometría espacial variable y densidad de corriente heterogénea. Pues bien, un LFP está formado por la mezcla de los potenciales generados por multitud de sinapsis distribuidas en un elevado número de neuronas y por tanto, depende de la distribución conjunta de todas estas fuentes de corriente, tanto originadas por las zonas de membrana activas como por las pasivas. Es fácil intuir que buena parte de los sumideros y fuentes de corriente microscópicos se cancelan mutuamente. Tan sólo aquellas regiones del tejido en los que la cancelación no sea total, esto es, que presenten una acumulación neta de corrientes, generarán un potencial eléctrico de magnitud observable. Por tanto, la distribución de las fuentes y sumideros dependerá tanto de las conductividades del espacio extracelular e intracelular como de la conductividad y propiedades capacitivas de la propia membrana.

Los fenómenos electromagnéticos se describen mediante las ecuaciones de Maxwell (Maxwell, 1865). Para una correcta aplicación de dichas ecuaciones es necesario definir el objeto de estudio. Es conocido que las distintas escalas espaciales y la complejidad estructural del cerebro dificultan el establecimiento de una teoría perspicua del EEG (Lorente de Nó, 1947). En el estudio de la teoría electromagnética existen dos aproximaciones que se corresponden con otras tantas versiones de las ecuaciones de Maxwell:

- 1) Microscópica: Las ecuaciones son autocontenidas, esto es, junto con la ecuación de la fuerza de Lorentz, describen de forma completa y única la relación entre cargas, corrientes, campo eléctrico y campo magnético.
- 2) Macroscópica: Las ecuaciones están expresadas en términos de campos promediados en el espacio, en las que aparecen más incógnitas que ecuaciones. Para resolverlo es necesario añadir tres relaciones experimentales asociadas al material: la constante dieléctrica para aislantes, la conductividad para conductores y la permeabilidad para materiales magnéticos.

En electrofisiología se hace uso de la versión macroscópica debido a que los electrodos utilizados para registrar la señal eléctrica desplazan un pequeño volumen de tejido que, aunque pueda ser muy reducido, alberga a un elevado número de moléculas. Por esta razón, la señal captada debe ser entendida como un promedio de todo el volumen desplazado por el electrodo, que en la práctica se ajusta a la superficie activa de registro. Los parámetros experimentales juegan, por tanto, un papel importante.

En lo referente al medio conductor, los tejidos vivos exhiben propiedades combinadas tanto de materiales perfectamente dieléctricos (en los que las cargas se mueven y pueden ser almacenadas en distancias atómicas) como conductores (en los que las cargas se mueven libremente bajo la influencia de campos eléctricos), siendo las conductivas las prioritarias para el tratamiento de LFPs. La permeabilidad magnética no se tratará en esta Memoria puesto que no se va a trabajar con esta señal.

Hay que tener presente que, en el tejido, las cargas son iones positivos y negativos que se mueven libremente de forma que los de polaridad opuesta se atraen, apantallando así la mayor parte de sus campos eléctricos. Por este motivo, el potencial de una carga en el tejido biológico es despreciable a nivel macroscópico. Por tanto, el LFP no está producido por una distribución de cargas estacionarias como tal, sino por las corrientes sinápticas (activas y pasivas) que producen un flujo de iones positivos y negativos en el espacio intersticial. Por convenio la corriente tiene la dirección del sentido en que se desplaza la carga positiva y, siendo el conductor un medio volumétrico, se utiliza como magnitud de medida la densidad de corriente (A/m^3). Ésta, es proporcional a la velocidad con la que se mueven los iones, y se verá entorpecida de manera compleja por las colisiones con otros iones. No obstante, a nivel macroscópico, el tejido biológico se comporta como un conductor lineal, verificando la ley de Ohm:

$$\vec{J}(\vec{r}, t) = \sigma(\vec{r})\vec{E}(\vec{r}, t) \quad (1)$$

donde \vec{J} es la densidad de corriente, σ es la conductividad ($1/\Omega \cdot m$) y \vec{E} el campo eléctrico (V/m). En algunos casos, sobre todo en estudios experimentales, se hace conveniente el uso del inverso de la conductividad, denominado resistividad ($\Omega \cdot m$). Aunque la conductividad del cerebro puede aumentar con la frecuencia (Polk y Postow, 1986), el efecto macroscópico es despreciable en el rango de frecuencia de interés del LFP (<300 Hz). La asunción de que el medio es meramente resistivo, sin efectos capacitivos (es decir, no tiene propiedades dependientes de la frecuencia), sigue siendo tema de debate hoy en día (Gabriel et al., 1996; Bedard et al., 2006; Nunez y Srinivasan, 2006; Logothetis et al., 2007; Bedard y Destexhe, 2009; Dehghani et al., 2010; Bedard y Destexhe, 2011; Einevoll et al., 2013; Leski et al., 2013). Sin embargo, aunque puedan existir ciertas propiedades que dependen de la frecuencia de la señal, su contribución al estudio del LFP parece ser menor (Nunez y Srinivasan, 2006).

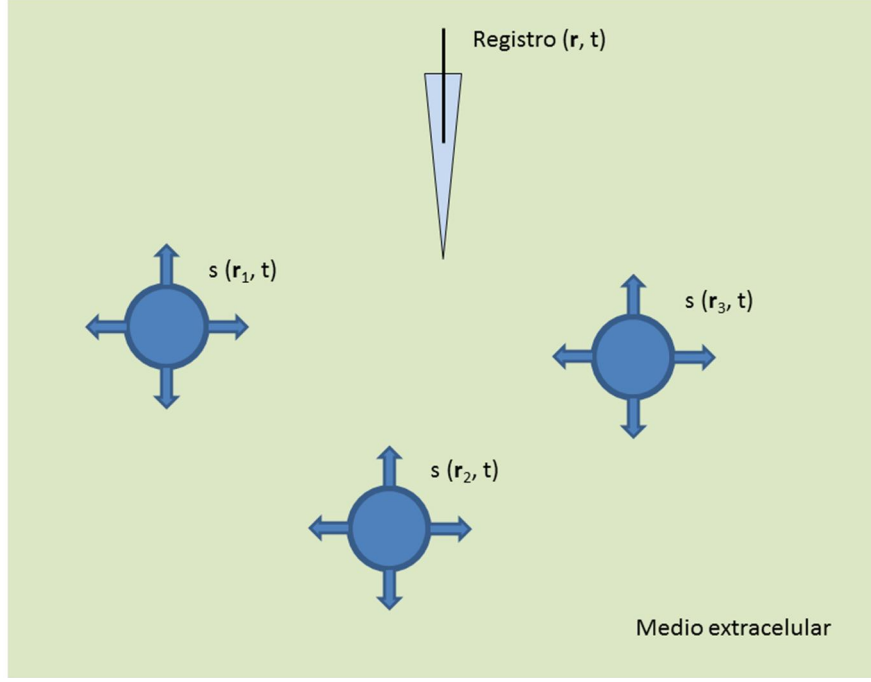


Figura 2. Esquema de fuentes de corrientes individuales inmersas en un conductor con volumen. El medio extracelular representa un conductor de volumen en el cual existen fuentes de corrientes aisladas del medio y representadas por círculos (simbolizando neuronas individuales). Cada fuente de corriente tiene una posición en el espacio y produce una corriente, en cada instante de tiempo, que entra (fuente) o sale (sumidero) al conductor de volumen.

En definitiva, se parte de un volumen en el que se producen movimientos de cargas y, por tanto, corrientes. En todo instante y punto del espacio debe cumplirse la ecuación de la conservación de la carga, derivada de las ecuaciones de Maxwell:

$$\nabla \cdot \vec{J}(\vec{r}, t) + \frac{\partial \rho(\vec{r}, t)}{\partial t} = 0 \quad (2)$$

donde ρ es la densidad de carga libre (C/m^3). Al ser un medio prácticamente resistivo no se producirá ninguna acumulación de cargas, por lo que el segundo término de la expresión anterior se anulará, quedando:

$$\nabla \cdot \vec{J}(\vec{r}, t) = 0 \quad (3)$$

Por motivos prácticos, se introduce en la ley de Ohm un nuevo elemento \vec{J}_s que representa una fuente de densidad de corriente (Geselowitz, 1967; Malmivuo y Plonsey, 1995):

$$\vec{J}(\vec{r}, t) = \sigma(\vec{r})\vec{E}(\vec{r}, t) + \vec{J}_s(\vec{r}, t) \quad (4)$$

siendo la densidad de corriente total en el conductor de volumen la suma de una parte óhmica $\sigma \vec{E}$ y una fuente de corriente \vec{J}_s que atraviesa la membrana neuronal. El campo electromagnético generado por la actividad cerebral tiene una frecuencia de oscilación muy baja, por lo que el campo eléctrico y el magnético se encuentran desacoplados, y pueden estudiarse haciendo una aproximación cuasiestática (Plonsey y Heppner, 1967). Esto permite, entre otras cosas, hacer uso de una magnitud escalar como es el potencial eléctrico (Φ), en lugar del campo eléctrico (\vec{E}) que es vectorial, lo que simplifica mucho el cálculo y el manejo de datos:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = -\nabla\Phi(\vec{r}, t) = -\left(\frac{\partial\Phi(t)}{\partial x}\vec{i} + \frac{\partial\Phi(t)}{\partial y}\vec{j} + \frac{\partial\Phi(t)}{\partial z}\vec{k}\right) \quad (5)$$

Sustituyendo en la ecuación de la conservación de carga se tiene la ecuación de Poisson:

$$\nabla \cdot [\sigma(\vec{r})\nabla\Phi(\vec{r}, t)] = -s(\vec{r}, t) \quad (6)$$

donde $s(\vec{r}, t) \equiv -\nabla \cdot \vec{J}_s(\vec{r}, t)$ representa la fuente de corriente en el volumen (Fig. 2). De esta forma, obteniendo la solución a la anterior ecuación, se puede calcular el LFP en todo instante y posición si las fuentes de corriente son conocidas. Considérese el caso de N elementos de fuentes de corriente cuyo volumen es mucho menor que la distancia a la que se quiere calcular el LFP (punto que se corresponde con el electrodo de registro en una situación experimental). Simplificando al caso más sencillo en el que el medio es un conductor de volumen puramente resistivo, isotrópico, homogéneo e infinito, el LFP en el instante t y posición \vec{r} viene dado por:

$$\Phi(\vec{r}, t) = \frac{1}{4\pi\sigma} \sum_{i=1}^N \frac{I_n(t)}{|\vec{r} - \vec{r}_n|} \quad (7)$$

donde $I_n(t)$ es la corriente transmembrana (A) en un dominio de membrana n localizada en \vec{r}_n que fluye hacia un medio de conductividad σ . La conductividad presentará un valor intermedio entre la membrana y el medio iónico. Este valor varía en distintas regiones dependiendo de la densidad celular y de la fracción de volumen intersticial. No obstante, la alta resistividad de las membranas hace que la corriente fluya en mayor proporción por el espacio extracelular, a pesar de la alta densidad celular (Cole, 1935; Cole, 1969). En el córtex cerebral, se ha estimado que las neuronas ocupan un 40-50% del volumen total y las células gliales el 35-56%, mientras que el espacio intersticial sólo el 2-20% (Van Harrevel, 1966). En el hipocampo de roedores adultos la fracción de volumen varía entre 10% en el neuropilo y un 4-5 % en las capas de somas celulares (McBain et al., 1990).

Aunque los fundamentos biofísicos del LFP están bien establecidos desde hace más de medio siglo (Lorente de Nó, 1947; Plonsey, 1969; Elul, 1971), persisten ciertos problemas de índole tanto técnica como teórica, que dificultan considerablemente la interpretación del mismo. Todos ellos derivan del hecho de que los potenciales de campo tienen valores diferentes en el espacio, de manera que las dificultades experimentales para obtenerlos han llevado a un tratamiento exclusivo de las fluctuaciones temporales en puntos discretos, normalmente únicos, registrados por un solo electrodo. Dadas las consideraciones anteriores, es evidente que un registro único es escasamente representativo de las corrientes extracelulares y está sujeto a varios tipos de problemas. Uno técnico, que consiste en la pérdida de línea base ocasionada por el registro mediante amplificadores acoplados en corriente alterna o AC (por sus siglas en inglés: *Alternate Current*). Otro es intrínseco, cual es la naturaleza dipolar de las fuentes de corriente en el cerebro y principal causante de la cancelación de corrientes en distintas escalas espaciales. Y un tercero es de tipo analítico, que deriva de la propia naturaleza compuesta o multiorigen del LFP.

En relación con el origen múltiple, la señal eléctrica registrada está contribuida por corrientes generadas por la actividad de distintas poblaciones neuronales que se mezclan en el tiempo y el espacio adoptando estructuras espaciales complejas y cambiantes (Fig. 3). Las distintas poblaciones neuronales aferentes tienen territorios sinápticos en la población diana que pueden abarcar zonas disjuntas o solapadas. Además, pueden seguir cursos temporales muy dispares, desde una sincronización perfecta hasta una independencia total (Makarova et al., 2010; Herreras et al., 2015). Por otro lado, muchas vías anatómicas se organizan topológicamente, de manera que los territorios sinápticos se activarán de manera parcial siguiendo la secuencia de los estímulos naturales que activan sus campos receptivos específicos. Todo ello, junto con la propia dinámica intracelular de las corrientes, hace que los potenciales producidos por distintas vías se superpongan con valores diferentes en distintos puntos del espacio, generando un LFP muy heterogéneo. La posición del electrodo de registro es, por tanto, decisiva. Además, es crucial tener en cuenta que la superposición de estos potenciales tiene un carácter instantáneo. Por tanto, en un punto e instante dados el LFP tendrá contribución de dos o más orígenes distintos si existe solapamiento temporal entre las respectivas corrientes, que puede ser total o variable teniendo presente que los PSPs extracelulares tienen una duración considerable (decenas a centenas de milisegundos) desde que se inicia en la sinapsis. Si bien el curso temporal de la corriente de una sola sinapsis depende de la dinámica de los canales asociados a los receptores sinápticos, el de la corriente macroscópica multisináptica dependerá también de las propiedades del medio. Así, existe la posibilidad de que la señal registrada (o parte de ella) en un punto no pertenezca exclusivamente a corrientes producidas de forma local por sinapsis cercanas, sino que provenga de un punto lejano propagado por el volumen, siendo estas

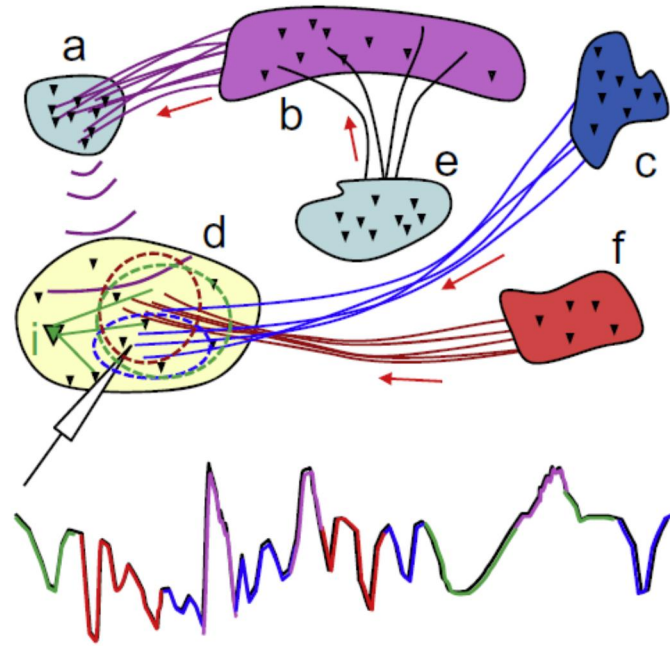


Figura 3. El LFP en un punto está producido por la combinación de actividad local y remota.

Al registrar el LFP en un punto de la población *d* se obtiene una mezcla de la señal local producida por las aferencias de las poblaciones distantes *c* y *f*, así como de otra población local (triángulo verde). También se registra el potencial producido localmente en la población *a*, que a su vez está generado por la actividad de otra población (*b*) y se conduce por el volumen. (Tomado de Herreras et al., 2015).

susceptibles de circular de manera heterogénea dependiendo de la conductividad diferente de distintas regiones cerebrales.

La necesidad de identificar los orígenes de los LFPs de diferentes regiones y durante distintos estados de actividad, así como en tareas comportamentales específicas, ha estimulado el desarrollo de multitud de técnicas y análisis. Mediante ellas, y a pesar de las deficiencias inherentes al estudio de una señal mezclada, se han establecido los circuitos neuronales que dan lugar a determinadas actividades oscilatorias (Csicsvari et al., 2003), así como la función de determinados circuitos en el comportamiento animal (Colgin et al., 2009). En cuanto a la comprensión del LFP como tal, en los últimos años, una de las aproximaciones que se ha mostrado particularmente útil es el uso de técnicas de separación ciega de fuentes mediante la implementación de análisis de componentes independientes o ICA (por sus siglas en inglés: *Independent Component Analysis*; Makarov et al., 2010; Korovaichuk et al., 2010; Benito et al., 2014; Schomburg et al., 2014). Sin embargo, aún quedan por dirimir otros problemas nada desdeñables, relacionados con la falta de una línea base en las fluctuaciones de la señal eléctrica registrada y con diversos factores locales por los que una misma población neuronal aferente

puede producir LFPs diversos en distintas estructuras de destino o poblaciones diana postsinápticas. Ambos aspectos serán estudiados en esta Memoria.

1.3 IMPORTANCIA DE LA LÍNEA BASE EN LOS REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Es importante tener en cuenta que al registrar el potencial eléctrico en un punto, este se referencia con respecto a otro punto, de forma que se mide como una diferencia de potencial, por lo que en general carece de sentido hablar de valores absolutos (Nunez y Srinivasan, 2006). En el caso que atañe a esta Memoria el punto en que se registra un LFP se encuentra dentro del cerebro y se referencia con respecto a otro punto alejado de las fuentes eléctricas cerebrales de interés y con actividad propia mínima o nula, como un electrodo situado en el músculo del cuello.

El LFP suele presentar un patrón temporal irregular y complejo en el cual aparecen intercaladas épocas de actividad oscilatoria con frecuencias características (Bullock et al., 2003). Sin embargo, también existen fluctuaciones ultralentas o potenciales sostenidos que son captados con amplificadores acoplados en corriente continua o DC (por sus siglas en inglés: *Direct Current*). Estos potenciales cerebrales, que son habituales en los registros intracelulares, fueron observados por primera vez en el cerebro de rana por Gerard y Libet en 1940. Años después Gloor y colaboradores estudiaron dichos potenciales en el hipocampo de gato y los denominaron “potenciales de reposo”, aunque no se asociaban a ningún tipo de estado en particular, sino a la actividad basal espontánea (Gloor et al., 1963). En la Figura 4 puede apreciarse como este potencial sostenido varía a través de las capas que constituyen un perfil del hipocampo (Región de CA1 y Giro Dentado), siendo más negativo en los dominios dendríticos en comparación con las capas somáticas. Aunque el cero (línea base) que aparece es arbitrario al estar referenciado con respecto a algún otro punto, puede observarse como varía con la profundidad y cuya magnitud hace que, en algunos casos, los potenciales provocados apenas suponen una pequeña perturbación sobre el mismo. Lejos de ser un *offset* artificial o una mera curiosidad, puede apreciarse como la deflexión transitoria negativa de la zona dendrítica correspondiente a una excitación (EPSP) está superpuesta a un valor sostenido del potencial DC que tiene valor más positivo que la deflexión somática positiva transitoria correspondiente a las corrientes pasivas de retorno.

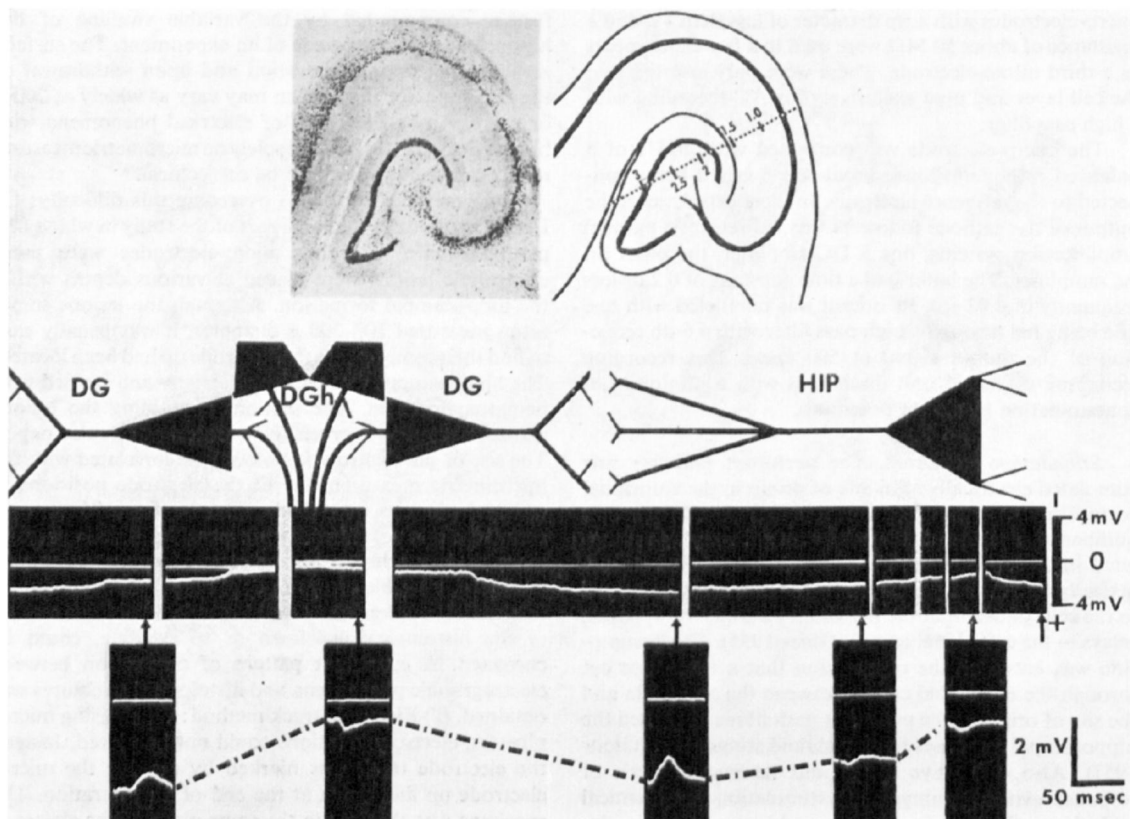


Figura 4. Potencial sostenido (DC) en la región de CA1 y Giro Dentado. En el panel superior se presenta un corte histológico y un esquema con el tracto realizado por el microelectrodo. En los registros superiores se presentan los potenciales DC registrados en distintas profundidades. En los registros inferiores se representan respuestas individuales a estímulos de la vía perforante en distintas posiciones de la formación hipocámpica. En ambos registros se muestra una línea base arbitraria. Nótese que la polaridad negativa es hacia arriba (Tomado de Gloor et al., 1963).

La mera existencia de estos potenciales sostenidos requiere que los registros se realicen en modo DC para conseguir una correcta interpretación de las fluctuaciones y oscilaciones visibles en la fracción fluctuante o rápida que se obtiene con acoplamiento en AC, y en la cual este componente sostenido es desechado. Es importante tener en cuenta que estos potenciales DC no son un simple *offset* estático en el tiempo, sino que sufren modulaciones por actividad y pueden estar asociados a algún estado de funcionamiento global, como en el caso del ritmo theta (Brankack et al., 1993). Al igual que la fracción rápida, el componente DC tampoco es estático en el espacio, sino que varía en función de las vías sinápticas que se activan o silencian en sus respectivos territorios sinápticos. Durante la ejecución de una tarea comportamental (Fig. 5) como es una rata corriendo dentro de una rueda, caracterizado por oscilaciones theta en el EEG, aumenta la negatividad sostenida en dos regiones distintas del hipocampo, llegando a alcanzar más de 2 mV en el *stratum moleculare*. Cuando se realiza un perfil de los potenciales y corrientes del ritmo theta a lo largo de la profundidad del hipocampo, comparando los modos AC y DC, se observan situaciones muy distintas. En el registro en AC aparece un patrón

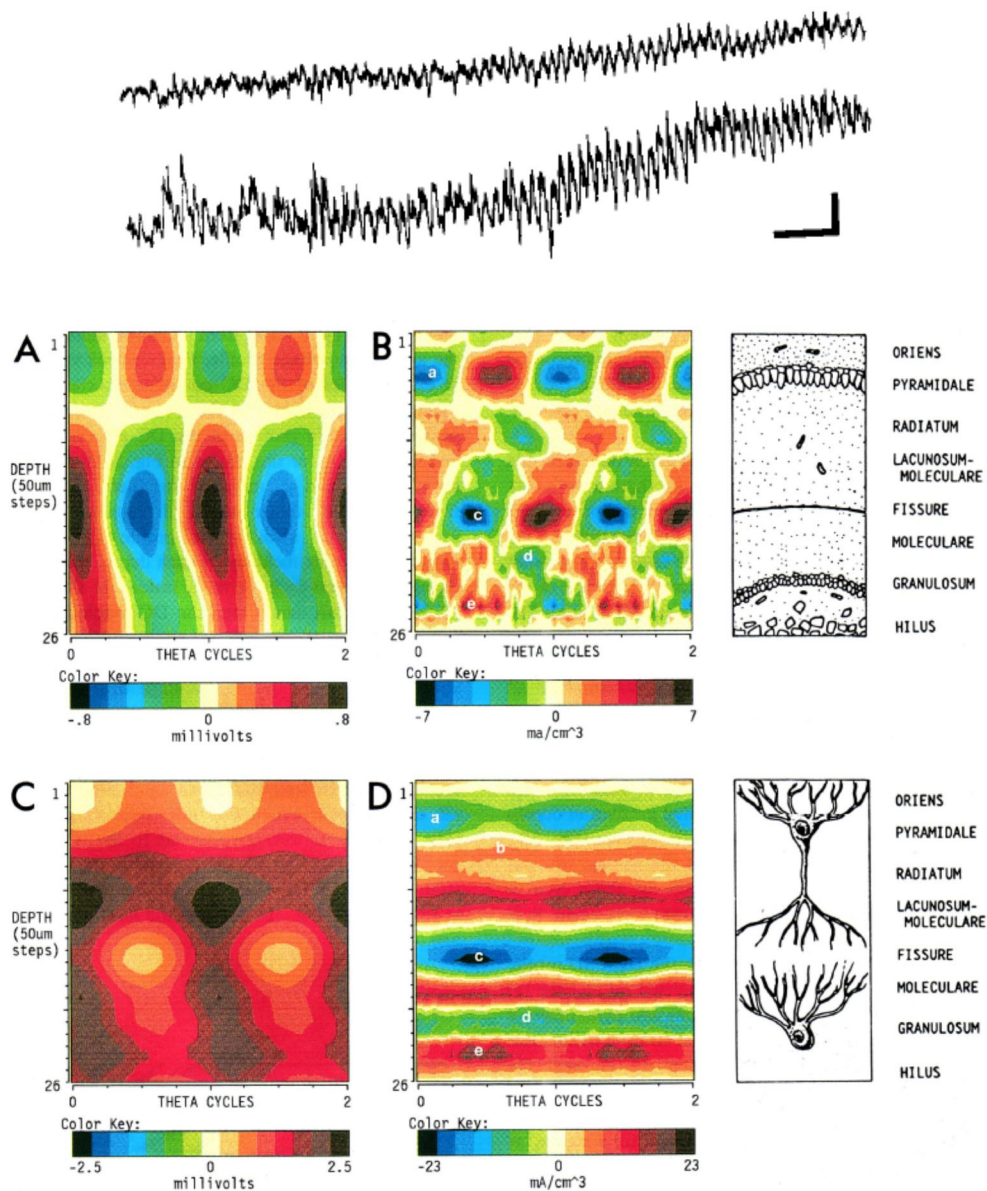


Figura 5. Potencial DC asociado a señales oscilatorias del LFP. En el panel superior se muestran dos registros de LFP simultáneos en el *stratum oriens* de CA1 (trazo superior) y en el *stratum moleculare* del Giro Dentado (trazo inferior), registrados en una rata despierta. En el instante correspondiente a la mitad del registro la rata comenzó a correr en una rueda. Escalas: 1s/1mV (negatividad hacia arriba). En el panel inferior se muestran mapas de contorno de perfiles de voltaje (A,C) y CSD (B,C) en registros acoplados en AC (A,B) y DC (C,D). A la izquierda se presenta un esquema representando las capas correspondientes a los perfiles de potencial y CSD. (Modificado de Brankack et al., 1993).

alternante positivo/negativo típico que se aminora hasta ser escasamente relevante en el modo DC, cuya gran amplitud absorbe la de las ondas theta con valor pico a pico de magnitud inferior. Además, en el modo DC se recupera la polaridad real de la oscilación en cada instante y punto del perfil, siendo tanto picos como valles de la misma polaridad neta.

Aunque el origen de estos potenciales DC no se haya estudiado expresamente, se asume que en gran parte es de origen sináptico (Brankack et al., 1993). Pueden existir, no obstante, otras fuentes tales como la glía (Héja et al., 2012) o canales extrasinápticos (Caraiscos et al., 2004; Pavlov et al., 2009; Marowsky et al., 2012), aunque su contribución sería despreciable. Por tanto, estos potenciales ultralentos se corresponderían con la envolvente producida por la entrada sináptica sostenida de una vía determinada, al igual que las fluctuaciones rápidas, que tan sólo constituyen los cambios menores y transitorios de una actividad no estacionaria.

Sin embargo, en cada población neuronal confluyen multitud de proyecciones provenientes de diversas vías, cada una con dinámica temporal, territorio sináptico y naturaleza química particulares. Por tanto, la actividad resultante registrada como LFP en una zona determinada se corresponderá con la superposición lineal de los potenciales producidos por las distintas aferencias, cuya suma se espera que varíe a lo largo del eje de las células postsinápticas. En definitiva, el potencial producido por el conjunto de aferencias está compuesto por un componente lento DC y/o un componente rápido con una frecuencia mayor de 0.1 Hz, que engloban toda la actividad sea rítmica o irregular.

Históricamente, el estudio de las oscilaciones del LFP (y de forma más general, en el EEG) ha recibido una atención especial. En los primeros trabajos se consideraba la actividad rítmica como un buen punto de partida, y además contaba con herramientas matemáticas idóneas para un abordaje que, en su momento, se consideraba suficiente para la comprensión de la naturaleza del LFP (Berger, 1929). En las últimas décadas, sin embargo, los trabajos han estado motivados, y se han centrado, en su mayoría, en la búsqueda incesante de correlatos cognitivos y comportamentales, dejando de lado aspectos no resueltos de la naturaleza de la señal que sin embargo son cruciales para su correcta interpretación (Elul, 1971; Varona et al., 2000; Nunez y Srinivasan, 2006; Bedard et al., 2011; Denker et al., 2011; Schomburg et al., 2011). En términos de computación, las oscilaciones del LFP pueden ser entendidas como ventanas temporales que controlan la sincronización de vías convergentes y que tienen un papel en la formación de grupos neuronales funcionales o *assemblies* (Lopes da Silva, 1991). Estas oscilaciones presentan fluctuaciones en la amplitud, duración y localización espacial, lo que refleja la compleja dinámica interna de las poblaciones aferentes (origen) y postsinápticas (diana) (Freeman, 1978; Bressler, 1987; Neville y Haberly, 2003; Fernández-Ruiz et al., 2012; Benito et al., 2014).

En términos eléctricos, el origen de las oscilaciones del LFP puede ser muy diverso, pues depende de las vías sinápticas que lo produjeron así como de la naturaleza química de éstas. El registro en modo AC de una oscilación LFP en una posición determinada a lo largo del eje del

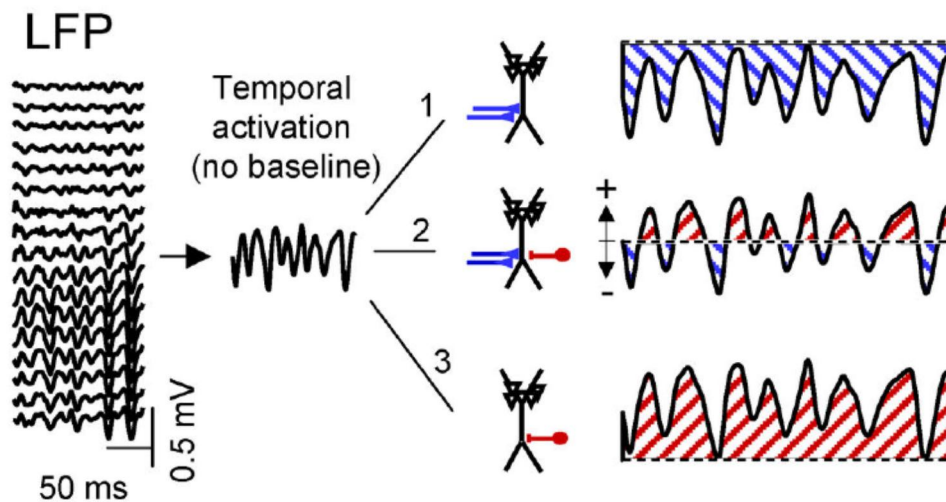


Figura 6. Posibles interpretaciones de una oscilación del LFP. Se muestra un perfil de LFPs registrados simultáneamente (registro acoplado en AC) en distintas posiciones a la largo del eje vertical de la región CA1 del hipocampo. La falta de una línea base de la oscilación gamma registrada impide determinar si se trata de (1) una excitación, (3) una inhibición o (2) una combinación de ambas. (Modificado de Martín-Vázquez et al., 2013).

grupo celular principal que lo produce (Fig. 6, panel izquierdo) podría explicarse, *a priori*, de tres maneras distintas (derecha). Puede deberse a una única entrada rítmica excitadora (vía 1) o inhibidora (vía 3), o a la sucesión temporal precisa de una vía de cada tipo (2). La eliminación de la línea base producida por el filtrado pasa-altos en AC elimina la posibilidad de discriminar entre estas posibilidades, pues todas ellas producen idéntico patrón temporal. Además, en cada una de las tres situaciones podría haber más de una vía coactivada que, pudiendo ser inferido de una distribución espacial compleja de los LFPs con registros en modo DC, tampoco puede deducirse de la observación directa en registros AC. A nivel práctico se cometen gran número de excesos de interpretación. Por ejemplo, picos y valles dejan de tener sentido fisiológico como fluctuaciones oscilantes de una entrada, y son a menudo interpretados como entidades distintas de carácter alternante (vía 2) sin razón objetiva alguna. En definitiva, la señal oscilatoria obtenida es una sucesión de ciclos de los que se desconoce la polaridad real debido a la falta de una línea base de referencia.

Otro error paradigmático es el que se produce en los análisis de fase entre el LFP y el disparo de neuronas. Por un lado, la eliminación de la línea base impide encontrar una relación temporal para todas las espigas que no tienen una relación con los picos o valles, generando un alto nivel de “disparo inespecífico” que se interpreta como no relacionado con la entrada sináptica que se está considerando en el LFP. Por tanto, además de desconocer la naturaleza química de dicha oscilación, se carece de un punto de referencia temporal para el inicio de cada ciclo, esto es, el inicio de la activación sináptica, lo que impide discriminar las relaciones causa-efecto entre

éstas y las espigas, no siendo posible establecer si el disparo es pre- o postsináptico respecto al LFP (ver Apartado 3.1). Sin información adicional, la relación de fase entre el LFP y el disparo de una neurona dará un resultado de pobre interpretación fisiológica (Lasztóczy y Klausberger, 2014).

Finalmente, en estructuras laminares como la corteza cerebral o el hipocampo, esta ambigüedad inherente al LFP registrado en modo AC puede reducirse, al menos en parte, mediante el uso del análisis de fuentes de corrientes o CSD (por sus siglas en inglés: *Current Source Density*), que a partir de los gradientes espaciales del LFP estima las corrientes transmembrana que lo generan (Lorente de Nó, 1947; Freeman y Nicholson, 1975; Rappelsberger et al., 1981). De esta forma, se eliminan los componentes del LFP conducidos por el volumen desde fuentes lejanas, lo que permite identificar los dominios subcelulares en los cuales hubo un flujo neto de corriente a través de la membrana, hacia el interior o el exterior de la célula (sumidero o fuente, respectivamente). Esta aproximación se ha mostrado particularmente útil en el estudio de potenciales provocados eléctricamente en los que se activa mayoritariamente una vía específica y en los cuales se conoce el instante del inicio de la actividad (Freeman y Nicholson, 1975; Mitzdorf y Singer, 1977; Rodríguez y Haberly, 1989; Herreras, 1990; Golarai y Sutula, 1996; Wu et al., 1998). De esta forma, y correlacionando con los datos anatómicos de la vía activada, se puede determinar en qué dominios se produjeron corrientes sinápticas (mediadas por canales iónicos transmembrana) y en cuáles las corrientes son pasivas (corrientes capacitivas de retorno a través de la propia membrana). Sin embargo, el uso del CSD no se ha mostrado particularmente útil sobre un LFP espontáneo. Cuando se aplica el análisis de CSD a un LFP oscilatorio se obtiene una sucesión temporal de fuentes y sumideros tanto en los dominios activos como en los pasivos, debido, de nuevo, a la falta de la línea base real (Brankack et al., 1993; Ketchum y Haberly, 1993; Bragin et al., 1995; Ylinen et al., 1995; Steriade y Amzica, 1996; Castro-Alamancos, 2000; Csicsvari et al., 2003; Neville y Haberly, 2003; Mann et al., 2005; Sotero et al., 2015). En la Figura 5 mostrada anteriormente, hay un ejemplo claro de este patrón en el CSD del ritmo theta en el hipocampo. En la mayoría de los casos, los sumideros y fuentes serán espurios, no pudiéndose determinar de forma correcta la polaridad ni la magnitud de dichas corrientes.

1.4 OTROS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA GENERACIÓN DEL LFP

1.4.1 Conducción por volumen

Cualquier tarea cognitiva o comportamiento animal es consecuencia de complejos procesamiento que tienen lugar en el cerebro y en los que participan distintas redes neurales y numerosas poblaciones neuronales. Cada una de ellas, al activarse, envía a través de sus axones la información procesada a otras regiones del cerebro, donde será procesada de nuevo junto con el resto de aferencias sinápticas (Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934). Por tanto, existe una dispersión del flujo de información que, desde cada población, es enviada con un contenido, en principio idéntico, a estructuras diversas donde podrán generar LFPs (Elul, 1971; Nunez and Srinivasan, 2006). Sin embargo, el hecho de que existan LFPs similares y correlacionados en dos regiones distintas no implica necesariamente que ambas estén recibiendo una aferencia común. Esto es debido a que el campo eléctrico generado por las neuronas se extiende en el espacio lejos de las mismas (Kajikawa y Schroeder, 2011; Fernández-Ruiz et al., 2013) de forma que los registros captan el mismo campo eléctrico en distintos puntos del espacio. La conducción de la señal en el volumen puede, por tanto, hacer que el análisis de LFPs en distintas regiones dé lugar a correlaciones espurias en las que se interpreta la existencia de una conectividad entre las regiones estudiadas, que en realidad no existe.

Incluso en situaciones en las que las señales de LFP registradas en dos regiones distintas son realmente locales y se halla correlación entre ellas, existe la duda de si ambas regiones están conectadas sinápticamente y por tanto la actividad de una es subsidiaria (disinápica) de la otra (Eckhorn et al., 1988; Bressler et al., 1993; Roelfsema et al., 1997), o bien ambas reciben una entrada común (Chawla et al., 2001; Rajagovindan y Ding, 2008). Es claro que una u otra conclusión implica modos radicalmente diferentes de entender cómo dos regiones, estructuras o poblaciones neuronales participan en el procesamiento de la información.

1.4.2 Citoarquitectura

Recientes estudios teóricos y experimentales añaden un nivel de complejidad adicional. Se ha demostrado que existen múltiples factores que afectan a la extensión espacial y amplitud de los LFPs, tales como la morfología de las células postsinápticas o la configuración tridimensional de los territorios sinápticos (Lindén et al., 2011; Fernández-Ruiz et al., 2013; Benito et al., 2014). Por tanto, cabe esperar que la actividad de una población neuronal genere LFPs diversos en estructuras diana distintas, lo que puede llevar a conclusiones erróneas si los análisis no persiguen la identificación inequívoca de las poblaciones origen y diana.

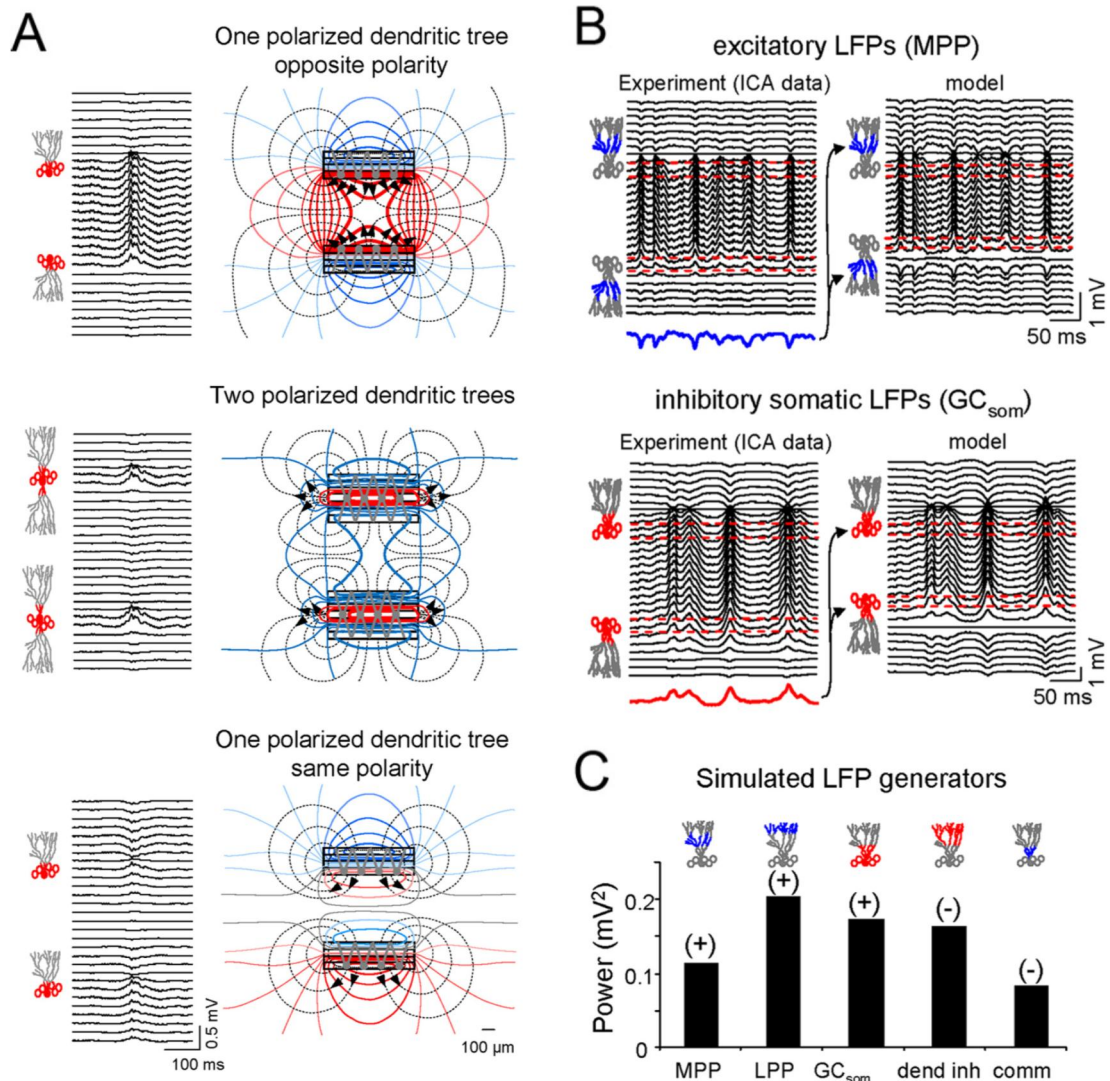


Figura 7. Dependencia estructural de la generación de LFP. **A)** Modelo de generación de LFP en poblaciones de células granulares en el Giro Dentado activadas por una inhibición somática con una configuración realista (panel superior), con dos estructuras dendríticas polarizadas (panel medio) y con una disposición en serie de las capas del Giro Dentado (panel inferior), en lugar de su disposición enfrentada real. **B)** Comparación de registros experimentales (izquierda) y cálculos en el modelo (derecha) de una excitación dendrítica (panel superior; banda azul) y una inhibición somática (panel inferior; banda roja). **C)** Potencia del LFP en el Hilus del Giro Dentado para distintas simulaciones con excitaciones (banda azul) e inhibiciones (banda roja) utilizando distintos dominios sinápticos. El signo entre paréntesis sobre cada histograma indica la polaridad del LFP del cual se obtuvo la potencia. (Modificado de Fernández-Ruiz et al., 2013).

En la Figura 7 están representados varios ejemplos. En un modelo computacional que simulaba una inhibición perisomática sobre las células granulares del Giro Dentado del hipocampo con citoarquitecturas realistas o imaginarias se observó que tanto la disposición de las capas del Giro Dentado (con capas de neuronas enfrentadas o en paralelo) como la estructura dendrítica (monopolar o bi-estratificada) eran decisivas a la hora de generar LFP (Fig. 7A). La estratificación sináptica de la aferencia axonal (territorio sináptico) también revelaba un fuerte impacto en el LFP, llegando incluso a invertirse su polaridad en el espacio entre capas celulares denominado Hilus (Fig. 7B,C).

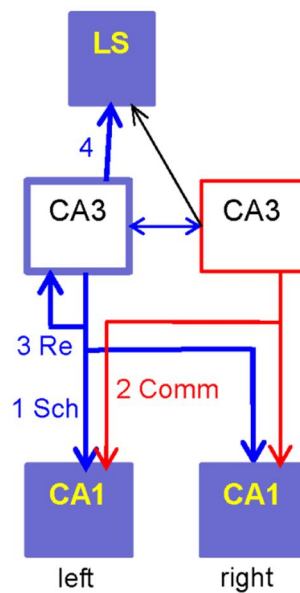


Figura 8. Las células piramidales de la región CA3 conectan con diversas estructuras. Se presenta un esquema con las principales eferencias de las células piramidales de CA3. (1) Vía ipsilateral CA3-CA1 a través de los colaterales de Schaffer, (2) Vía contralateral CA3-CA1 a través de las fibras comisurales, (3) Conexiones recurrentes excitadoras CA3-CA3 y (4) Conexión CA3-LS. (Modificado de Martín-Vázquez et al., 2015).

En esta Memoria se describirán los efectos de la citoarquitectura de distintas poblaciones diana utilizando como población neuronal de origen una de las más estudiadas y con proyecciones a un mayor número de estructuras distintas, cual es la región CA3 del hipocampo (Blackstad, 1956; Swanson et al., 1981). Este interés se debe, en parte, a su implicación en multitud de funciones superiores (Csicsvari et al., 2003; Montgomery y Buzsaki, 2007; Buzsaki y Wang; 2012). Se trata de una estructura bilateral que funciona como punto de encuentro entre la información cortical y la procedente de regiones más primitivas, evolutivamente hablando (Vinogradova, 2001). Las neuronas piramidales de dicha región emiten axones que ramifican y contactan una gran variedad de estructuras entre las que se encuentran: las regiones CA1 ipsi- y contralateral, el septum lateral o LS (por sus siglas en inglés: *Lateral Septum*) y la propia región CA3 (Fig. 8; Swanson et al., 1981).

Cada una de las estructuras mencionadas participa, a su vez, en distintos procesos cognitivos y comportamentales, con sus respectivos circuitos implicados. A pesar de que la región CA1 recibe entradas sinápticas de CA3 bilateralmente, los territorios sinápticos de llegada difieren ligeramente (Blackstad, 1956; Laurberg, 1979; Shinohara et al., 2012). Por su parte, la región CA1 integra además otras aferencias sinápticas provenientes de distintas regiones y poblaciones

neuronales, entre las que destacan la vía temporo-amónica desde la corteza entorrinal, el núcleo reuniens del tálamo y varias redes interneuronales locales, para posteriormente enviar a la corteza una información altamente elaborada que será necesaria para la navegación espacial y el procesamiento sensorial. En el caso del LS, la conexión CA3-LS regula la entrada sensorial y el ritmo theta, y participa en situaciones de ansiedad y de obtención de recompensa (Pedemonte et al., 1998; Takamura et al., 2006; Chee et al., 2015). Cabe destacar, que en esta proyección las células piramidales de la región de CA3 contactan sobre interneuronas cuya citoarquitectura difiere enormemente de la de las células piramidales del hipocampo (Panula et al., 1984). Por último, la conexión de CA3 sobre la propia CA3 ha sido propuesta como una de las partícipes en la generación del ritmo gamma (Csicsvari et al., 2003) así como en la compleción de patrones previamente segregados por el Giro Dentado (Marr, 1969; Marr, 1971; McNaughton y Morris, 1987; McNaughton y Nadel, 1989). Por tanto, las células piramidales de la región CA3 proyectan tanto a regiones con una misma citoarquitectura aunque estratificada de forma diferente (CA1 ipsi- y contralateral) como a regiones con distinta citoarquitectura (CA1, CA3 y LS).

La conexión de la región de CA3 a todas estas estructuras ha sido confirmada funcionalmente en diversos estudios en los que la estimulación de todas ellas activaba antidrómicamente células piramidales de CA3, y la estimulación de la propia CA3 producía potenciales provocados y disparos de neuronas de manera monosináptica en las células diana (DeFrance et al., 1973; McLennan and Miller, 1974; McNaughton and Miller, 1986; Herreras et al., 1987; Herreras, 1990; Leung et al., 2008). Así, las distintas estructuras están recibiendo una entrada excitadora con un patrón temporal idéntico que refleja la actividad espontánea del circuito neuronal de la región CA3. Esta actividad presenta dos modos destacados en el LFP o patrones temporales estereotipados que se corresponden uno, con el disparo hipsincrónico de una gran proporción de neuronas y da lugar a los eventos denominados Sharp Waves en la región CA1, y el otro, con el disparo conjunto de grupos de neuronas o *clusters*, que se activan de forma secuencial en una cadencia dentro de la frecuencia gamma (~45 Hz; Csicsvari et al., 2000; Buzsaki, 2010). En esta Memoria nos centraremos principalmente en esta actividad oscilatoria gamma cuyo carácter excitador ha sido descrito y caracterizado exhaustivamente mediante diversas pruebas complementarias (Fernández-Ruiz et al., 2012a,b).

1.4 OBJETIVOS

El objetivo genérico perseguido es la resolución de los problemas biofísicos que atañen a la interpretación correcta de los LFPs. Para ello se han focalizado los estudios fundamentalmente en la actividad de la región de CA3 por su bien conocida anatomía y fisiología, incluyendo particularmente sus conexiones con diversas estructuras donde los LFPs pueden separarse por su origen y ser comparados. Los objetivos principales fueron:

- El desarrollo de un método mediante el cual poder recuperar la línea base de oscilaciones del LFP y determinar su polaridad real.
- El estudio de los factores citoarquitectónicos y funcionales locales que promueven diversidad de LFPs generados por la aferencia sináptica común desde las células piramidales de la región CA3 en distintas regiones.
- Aplicación de la metodología optimizada al estudio del funcionamiento del segmento de circuito CA3-CA1 como estructura bilateral.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1.1. Cirugía

Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con las normas de regulación de la UE (86/609/EU) y España (BOE 67/85909-12, 1988) con respecto al uso de animales de laboratorio. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de investigación del Instituto Cajal.

Se utilizaron ratas hembras adultas Sprague-Dawley, que fueron anestesiadas con uretano (1.2 g/kg intraperitoneal), colocadas en un aparato estereotáxico (Narishige) y mantenidas a temperatura de 36,5° C mediante una manta termorregulada por sonda rectal. En todo momento se comprobó que el animal mantuvo un plano anestésico adecuado mediante la ausencia de reflejos musculares. Además, las zonas quirúrgicas fueron anestesiadas mediante torondas de algodón impregnadas con el anestésico de larga acción bupivacaína (2%). La cirugía y procedimientos estereotáxicos seguidos en todos los experimentos son de práctica generalizada y han sido descritos previamente en numerosos trabajos (Herreras et al., 1988; Canals et al., 2005). En la Tabla 1 se recogen las coordenadas estereotáxicas correspondientes a diferentes regiones cerebrales que fueron utilizadas en los distintos experimentos para estimulación eléctrica, inyección de fármacos y registros electrofisiológicos (Paxinos y Watson, 2007):

	Antero-posterioridad	Lateralidad	Profundidad
CA3	-2.9	±2.6	3.4
CA1	[-4.5 -5.5]	±2.6	[2 3.6]
LS	0.4	0.4	[3.8 5.4]
VHC	-1.5	0.5	

Tabla 1. Coordenadas estereotáxicas utilizadas. AP: coordenadas en el eje antero-posterior. L: coordenadas en el eje latero-medial. P: coordenadas en profundidad desde la superficie cerebral. CA3: Región de CA3b. CA1: Región de CA1. LS: Septum Lateral. VHC: Comisura Ventral Hipocampal. Todas las coordenadas están expresadas en milímetros y con respecto al punto de Bregma (Paxinos y Watson, 2007).

2.1.2. Estimulación y registro

Para la estimulación eléctrica, se utilizaron electrodos concéntricos hechos con una cánula exterior de calibre 26G y un cable de tungsteno de 125 μm recubierto de teflón y descubierto en 100-300 μm en su extremo activo. Los pulsos de corriente se generaron mediante un estimulador multicanal (Multichannel Systems, Reutlingen, Alemania) y consistieron en pulsos rectangulares de 0.1 ms, emitidos a distinta frecuencia (normalmente 0.1 Hz) e intensidad (0.1-1 mA) dependiendo de los requerimientos del protocolo específico.

Para los registros del potencial eléctrico de campo se utilizaron dispositivos multielectrodo de silicio (Neuronexus, Ann Arbor, MI) de 32 canales de registro dispuestos en forma lineal y separados 50 μm . En algunos experimentos ($n=3$), se utilizaron multielectrodos con cuatro lancetas en paralelo separadas por 150 μm , con dos tetrodos (grupos de cuatro canales de registro dispuestos en rombo) en cada una y separados verticalmente por 200 μm . Las señales fueron amplificadas y adquiridas utilizando hardware y software de MultiChannel Systems (Reutlingen, Alemania) con una frecuencia de adquisición de 20-50 kHz. Como referencia eléctrica para todos los registros se utilizó un electrodo de plata clorurado que fue introducido bajo la piel del cuello del animal.

2.1.3. Aplicación local de fármacos

La naturaleza química excitadora o inhibidora del LFP producido por distintas aferencias fue estudiada mediante la aplicación local de bloqueantes de receptores de neurotransmisores específicos. Se utilizó una pipeta (7-10 μm de diámetro en la punta) con un electrodo de plata clorurado rellena de una solución de Bicuculina metaioduro (BIC; Sigma, St. Louis, MO) o de 6,7-dinitro-quinolaxina-2,3-diona (DNQX; Tocris, Bristol, UK) para bloquear receptores Gabaérgicos (GABA_A) y de Glutamato de tipo no-NMDA, respectivamente. Los fármacos fueron disueltos en ACSF en concentraciones ~ 50 veces mayores que las usadas *in vitro*. La pipeta era introducida con una inclinación de 10° con respecto al eje vertical y se posicionaba en torno a 300-500 μm del dispositivo multielectrodo de registro en CA1. Se liberaron microgotas de 50-100 nL minimizando así la extensión de la droga, tal y como se podía comprobar en su efecto selectivo sobre los potenciales provocados. Mediante una inyección se obtenían efectos estables durante al menos 60 segundos. La inyección se realizó por presión de aire desde un inyector Picospritzer (General Valve), o manualmente mediante una jeringa de 50 ml, en ambos casos conectados a la pipeta mediante un tubo de plástico (PE-20) y un manguito de silicona.

Para discriminar la contribución ipsilateral de la contralateral desde las respectivas regiones de CA3 al LFP de la región CA1 se silenció reversiblemente la correspondiente al hipocampo izquierdo mediante la aplicación local de microgotas (0.1-0.2 μL) de lidocaína (bloqueante de

canales de Sodio; HCl 2%, Braun). Para la inyección se utilizó una cánula de sílice con un diámetro externo de 120 μm , conectada a un tubo de polietileno y éste a su vez a una jeringa (Hamilton) graduada de 5 μL . Dicha cánula se hacía pasar por el interior de otra cánula de acero inoxidable de 400 μm de diámetro externo junto con un hilo de tungsteno (30 μm de diámetro) recubierto de teflón y utilizado para el estímulo eléctrico. Este dispositivo permitía estimular eléctricamente en la misma posición en la que se inyectaba la lidocaína, pudiéndose así monitorizar la extensión de la lidocaína al observar la modulación de los potenciales provocados ipsilaterales (hipocampo izquierdo) y contralaterales (hipocampo derecho), ya que sus fibras provenientes de la comisura hipocámpica pasan sobre la región CA3 ipsilateral en su trayecto a la región de CA1. Generalmente, fueron necesarias entre una y dos inyecciones para bloquear completamente el potencial provocado en ambas regiones de CA1 durante al menos 10 minutos.

Para separar la actividad de ambos hipocampos sin interferir en las propias neuronas diana se inyectaron localmente microgotas (50-100 nl) de lidocaína en la comisura ventral hipocámpica o VHC (por sus siglas en inglés: *Ventral Hippocampal Commissure*). Se utilizó para ello una pipeta de vidrio (7-12 μm de diámetro) conectado mediante un tubo de plástico al sistema de presión (Picospritzer). La misma pipeta fue utilizada para estimular eléctricamente la comisura y así determinar la posición de la pipeta y el efecto de la lidocaína mediante la monitorización de los potenciales provocados en ambas regiones de CA1. El efecto de la lidocaína duraba alrededor de 2-3 minutos.

2.1.4. Histología

La localización de los electrodos fue comprobada mediante procesamiento histológico. Antes de su implantación los electrodos eran sumergidos en perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (DiI, Molecular Probes, Invitrogen, Carisbad, CA) en una solución de N-N-dimetilformamida al 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Al final de cada experimento, los cerebros fueron extraídos y fijados en una solución de paraformaldehído al 4% y tampón fosfato 0.1%. Posteriormente, se realizaron secciones sagitales de 100 μm de grosor que fueron teñidas con bis-benzimida y Nissl para su estudio mediante microscopía de fluorescencia.

2.2 SIMULACIÓN DE LFPS ESPONTÁNEOS

Para la simulación de LFPs se utilizaron modelos celulares matemáticos de distintas estructuras con sus correspondientes tipos neuronales y disposición poblacional. Todos los modelos estuvieron basados en el de las células piramidales de la región de CA1 que ha sido descrito y testado previamente (Varona et al., 2000; López-Aguado et al., 2002; Makarova et al., 2010;

Makarova et al., 2011). Por lo tanto, se describirá principalmente este modelo neuronal de CA1 y se indicarán las modificaciones realizadas en las distintas estructuras. Brevemente, diseñamos una estructura que contenía cuatro componentes acoplados: i) la actividad de las poblaciones aferentes, ii) la dinámica de las células postsinápticas individuales, iii) la arquitectura del agregado celular y iv) el LFP generado en el espacio extracelular.

2.2.1. Simulación de las entradas sinápticas

Previamente se ha demostrado que los LFPs generados por aferencias con una contribución débil, medida en porcentaje sobre la varianza total, pueden verse contaminadas por otras entradas más potentes durante el proceso de separación (descrito más abajo), debido a interacción intracelular no lineal con otras conductancias sinápticas coincidentes (Makarova et al., 2011). Por tanto, salvo que se especifique lo contrario, se utilizaron combinaciones de entradas en las que la aferencia de interés tenía una varianza relativa similar a la observada experimentalmente (Korovaichuk et al., 2010; Fernández-Ruiz et al., 2012a).

2.2.1.1. Entrada excitadora (Schaffer) e inhibidora (perisomática y apical distal) a las células piramidales de CA1

Los LFPs artificiales fueron obtenidos mediante la combinación de tres entradas sinápticas en bandas discretas simulando las aferencias a territorios sinápticos estratificados de las células piramidales de la región CA1. Una corresponde a la entrada excitadora desde los colaterales axónicos de Schaffer provenientes de la región de CA3 ipsilateral a las dendritas apicales y basales de la región CA1. Otras dos entradas inhibitorias correspondieron una a la inhibición perisomática mediada por células en cesto y la otra localizada en la porción distal de las dendritas apicales, mediada por células Or-Lac (con soma en el *stratum oriens* y plexo axónico en el *stratum lacunosum-moleculare*). La información anatómica fue obtenida de datos experimentales previos (Korovaichuk et al., 2010; Benito et al., 2014). Para las entradas excitadoras e inhibitorias se utilizaron las cinéticas estándar de receptores de glutamato (no NMDA) y GABA_A, respectivamente (Makarova et al., 2011).

Todas las neuronas del agregado recibieron la misma entrada sináptica. Para cada tipo de entrada se simuló una actividad que fue, bien rítmica (Schaffer), bien aleatoria con una distribución de Poisson (aferencias inhibitorias). La inhibición perisomática fue distribuida homogéneamente en las dendritas basales (desde unas 50 μm del soma) a las dendritas apicales (hasta unas 100 μm del soma; la longitud total de la célula piramidal fue de 750 μm), y activada con una frecuencia media de 300 Hz. La inhibición apical distal abarcó la región dendrítica desde 400 a 500 μm de distancia al soma (equivalente al *stratum lacunosum-moleculare*) y su activación temporal fue generada mediante la combinación de dos series temporales de entradas

aleatorias (con una frecuencia media conjunta de 260 Hz), moduladas por periodos de activación/desactivación también aleatorios. De esta forma se obtenían fluctuaciones temporales considerables y, por tanto, una contribución relativa mayor a la varianza del LFP (>50%; Benito et al., 2014). La entrada de Schaffer se localizó, en este grupo de simulaciones, sobre una extensión reducida en las dendritas apicales abarcando desde 150 a 300 μm de distancia del soma (equivalente al *stratum radiatum*) con una frecuencia de entrada media de 40 Hz, prescindiendo de su entrada en las dendritas basales.

2.2.1.2. Entradas excitadoras ipsilaterales (Schaffer) y contralaterales (comisurales) a las células piramidales de CA1

Otro grupo de simulaciones fue dirigido específicamente a comparar las dos entradas excitadoras correspondientes a la entrada ipsilateral de CA3 a través de los colaterales de Schaffer y la entrada contralateral de CA3 a través de fibras comisurales. Las entradas de ambas aferencias se localizaban en correspondencia precisa con sus dominios sinápticos (Laurberg, 1979), que solapan fuertemente en las dendritas basales (50-250 μm desde el soma) y parcialmente en las dendritas apicales (150-250 y 200-400 μm desde el soma para la entrada comisural y de Schaffer, respectivamente). Para simular la actividad de ambas aferencias, se utilizaron cursos temporales ligeramente asincrónicos, constituidos por excitaciones rítmicas gamma con retrasos temporales aleatorios entre las vías de <2 ms, para ajustarse a observaciones experimentales. No obstante, se modificaron los valores de dichos retrasos en distintas simulaciones para comprobar su efecto. La intensidad de los eventos individuales de la oscilación fue variable, reproduciendo así el patrón observado experimentalmente (Fernández-Ruiz et al., 2012a).

2.2.1.3. Entradas excitadoras ipsilaterales a las células de tipo interneurona en el LS

También se desarrolló un modelo del LS construyendo una neurona prototípica basada en la morfología descrita en estudios anatómicos (Alonso y Frotscher, 1989; Jakab y Leranth, 1990). Las entradas excitadoras desde CA3 abarcaban todas las dendritas salvo los segmentos de 25 μm más próximos al soma. El patrón de actividad utilizado fue el mismo que el de Schaffer.

2.2.2. Modelo celular

2.2.2.1. Célula piramidal de la región de CA1

Para la simulación de la dinámica del modelo de neurona de CA1 utilizamos parámetros realistas obtenidos de estudios morfométricos tales como el promedio de ramificaciones, la longitud total y grosor variable de las dendritas, así como la variación de la densidad de espinas dendríticas (Bannister y Larkman, 1995a, b; Trommald et al., 1995). El modelo neuronal de este estudio ha sido utilizado y testado previamente (Varona et al., 2000; López-Aguado et al., 2002;

Ibarz et al., 2006; Makarova et al., 2007; Makarova et al., 2010; Makarova et al., 2011). El modelo detallado es excesivamente voluminoso y puede encontrarse en: <http://www.cajal.csic.es/departamentos/herrerias-espinosa/ca12011/index.html>. Se utilizaron los siguientes parámetros:

- Longitud de los compartimentos (λ) = [0.01 0.2]
- Área total efectiva (incluyendo las espinas dendríticas) = $66.800 \mu\text{m}^2$
- Capacitancia de la membrana (C_m) = $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$
- Resistividad interna (R_i) = $100 \Omega \cdot \text{cm}$
- Resistividad de la membrana somática (R_m) = $50 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ (con variaciones en las dendritas apicales).

La resistencia de entrada (R_e) medida en el soma fue de $60 \text{ M}\Omega$ con una constante de tiempo de 18 ms. Las espinas dendríticas no fueron modeladas de manera explícita y su superficie fue colapsada en las dendritas sobre las que estaban localizadas, compensándose los valores de R_m y C_m en dichas dendritas. En las dendritas apicales el ratio de superficie entre las espinas dendríticas y las dendritas que las contienen fue de 1:1 (Bannister y Larkman, 1995), por lo que utilizamos un factor de corrección de 2 para los compartimientos con espinas (se multiplicó por 2 la C_m y se dividió por 2 la R_m). Se utilizaron doce tipos de canales iónicos diferentes para simular las propiedades activas de la membrana celular. La dinámica de las conductancias fue descrita mediante el formalismo de Hodgkin-Huxley (Ibarz et al., 2006; Makarova et al., 2007; ver URL anterior). Los potenciales de reversión fueron establecidos como $E_{\text{Na}} = 50 \text{ mV}$ y $E_{\text{K}} = -90 \text{ mV}$, siendo el de E_{Ca} variable y dependiente de la concentración de calcio.

Se utilizó una distribución de canales tal que reprodujera con precisión la electrogénesis poblacional y unitaria de la región CA1 (Varona et al., 2000; Makarova et al., 2006). Para evitar el disparo de potenciales de acción somato/axonal se disminuyó la densidad de conductancia de Na^+ en el axón por un factor de 100. No obstante, se mantuvieron los canales dependientes de voltaje en las dendritas. Dicha modificación fue necesaria para limitar el disparo neuronal que complican la interpretación debido a interacciones intracelulares con las corrientes subumbriles del LFP.

Las corrientes sinápticas fueron modeladas utilizando las ecuaciones siguientes:

$$i_{\text{syn}}(t) = g_{\text{syn}}(t)(V_m - E_{\text{syn}}) \quad (8)$$

$$g_{\text{syn}}(t) = \hat{g}_{\text{syn}} \left(\frac{t}{\tau_{\text{syn}}} \right) e^{\left(1 - \frac{t}{\tau_{\text{syn}}}\right)}, \quad t > 0 \quad (9)$$

donde se utilizaron valores para τ_{syn} de 2 y 7 ms, y E_{syn} de 0 y -75 mV para la entrada de glutamato (no-NDMA) y GABA_A, respectivamente. Por motivos de simplicidad, las conductancias sinápticas se distribuyeron homogéneamente en la superficie de todas las ramificaciones dendríticas en las respectivas bandas activas de cada entrada. Se utilizaron conductancias de 15 y 35 nS para las inhibiciones perisomáticas y de dendritas apicales distales, respectivamente. La conductancia de la entrada de Schaffer se hizo variable de 2 a 8 nS para reproducir los eventos de oscilación gamma observados experimentalmente (manteniendo el potencial de membrana bajo el umbral de espigas dendríticas locales; Ibarz et al., 2006).

Para el cálculo de las corrientes transmembrana y dinámica neuronal se utilizó el simulador GENESIS (Bower y Beeman, 1998). Se usó el método de Euler exponencial (explícito) con pasos de integración de $dt=1\mu s$.

2.2.2.2. Entradas excitadoras ipsilaterales (Schaffer) y contralaterales (comisurales) a las células piramidales de CA1

La densidad de conductancias sinápticas de ambas entradas excitadoras fue establecida en función de la densidad relativa de terminales axónicos observados experimentalmente (Shinohara et al., 2012). Se utilizaron 16,7 y 35,9 nS de conductancia máxima para la entrada comisural y de Schaffer, respectivamente, que al ser distribuida por todo el área dendrítica mantenían el potencial de membrana subumbral para espigas dendríticas (Ibarz et al., 2006). El ratio de densidad de conductancia basal/apical fue de 2/1 para la entrada comisural y de 1/4,5 para la entrada de Schaffer. No obstante, tanto la densidad de conductancias como el ratio basal/apical fueron modificados en distintas simulaciones para testar su efecto.

2.2.2.3. Célula piramidal de la región de CA3

Para evaluar el impacto de la conducción por volumen del LFP de CA3 a la región de CA1, diseñamos una región de CA3 idéntica en todos los aspectos a la de CA1 salvo en la arquitectura, usándose dos bloques de células piramidales que se emplazaron contiguos al de CA1 y dispuestos de manera que configuraron una estructura en forma de U característica (Fig. 21B).

2.2.2.4. Célula tipo interneurona del LS

El modelo de la neurona estaba formada por 25 compartimentos distribuidos en un soma (14 μm de diámetro) y 4 dendritas principales con una superficie total de 2850 μm^2 . No se implementaron conductancias dendríticas activas debido a la ausencia de datos experimentales al respecto. Se utilizó una densidad de conductancia de 0,06 nS/ μm^2 , que fue ajustada para obtener LFPs con un ratio de amplitud CA1/LS similar al registrado experimentalmente. La

orientación de las células fue similar (Jakab y Lanth, 1990), disponiendo las dendritas ligeramente axiales.

2.2.2.5. *Célula de morfología no realista*

También se diseñó un prototipo de neurona con características intermedias entre las células piramidales de CA1 y las células tipo interneurona del LS, con una configuración similar a las células granulares. La neurona tenía una superficie total de $5221 \mu\text{m}^2$ y constaba de 26 compartimentos distribuidos en un soma ($14 \mu\text{m}$ de diámetro) y 6 dendritas principales abiertas en un ángulo de $<90^\circ$.

2.2.3. Modelo del agregado neuronal

2.2.3.1. *Células piramidales de CA1*

La región dorsal de CA1 fue modelada como un bloque de $1 \times 1 \times 0.8 \text{ mm}$ (antero-posterior, lateral, profundidad) de tejido que contuvo 19.966 neuronas morfológicamente idénticas dispuestas paralelamente en forma de empalizada. La densidad celular fue de 64 neuronas en un cuadrado antero-lateral de $50 \times 50 \mu\text{m}$, tal y como se ha observado experimentalmente (Boss et al., 1987). Los somas de las neuronas se dispusieron en una capa de $50 \mu\text{m}$ de grosor. Al utilizar una misma actividad de entrada en todas las células de la población, los cálculos de corriente fueron realizados en una única célula modelo y se extrapolaron mediante replicación a la población completa usando transposición de las corrientes calculadas para cada compartimiento a sus coordenadas respectivas en el espacio. Previamente, se había comprobado que los efectos microscópicos debidos a la variabilidad entre células del agregado eran minimizados debido al promediado macroscópico de la señal (Varona et al., 2000; Makarova et al., 2010).

2.2.3.2. *Modelo del Septum Lateral*

Al no disponer de datos detallados sobre la estructura tridimensional del LS, se diseñó un bloque similar al de CA1, constituido por 16966 neuronas en un volumen de $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}$. También se construyeron modelos con un volumen mayor preservando la densidad celular.

2.2.4. Cálculo del LFP

Se asumió que el medio extracelular es homogéneo e infinito, con una conductividad constante de $\sigma=0.3 \text{ S/m}$ (López-Aguado et al., 2001). El comportamiento de la corriente en el espacio extracelular fue modelado por la ecuación de Poisson:

$$-\sigma \nabla^2 \phi(\vec{r}, t) = \sum i_n(t) \delta(\vec{r} - \vec{r}_o) \quad (10)$$

donde $i_n(t)\delta(\vec{r} - \vec{r}_n)$ se corresponde con la corriente transmembrana de la fuente puntual n con intensidad $i_n(t)$ obtenida anteriormente. En la suma contribuyen todas las células del agregado. La solución a la ecuación diferencial anterior en el centro del agregado es aproximada por:

$$\phi(\vec{r}, t) = -\frac{1}{4\pi\sigma} \sum \frac{i_n(t)}{|\vec{r} - \vec{r}_n|} \quad (11)$$

Para simular los registros electrofisiológicos experimentales realizados con multielectrodos, se calculó el potencial en puntos separados 50 μm y dispuestos verticalmente siguiendo el eje somatodendrítico. Los LFPs simulados en cada uno de estos puntos (electrodos) fueron dados por:

$$LFP_k(t) = \phi(0,0, kh, t) \quad (12)$$

donde k se corresponde con el número del electrodo numerado desde la superficie. Todos los cálculos relativos a la obtención del LFP fueron programados en MATLAB (MathWorks).

2.3 ANÁLISIS DE DATOS

Salvo que se indique lo contrario se analizaron fragmentos de tiempo en donde predominaba la actividad irregular de gran amplitud o LIA (por sus siglas en inglés: *Large Irregular Amplitude*), con un espectro de frecuencia relativamente amplio. En algunos casos se estudió específicamente la actividad theta (~ 4 Hz en animal anestesiado).

2.3.1. Análisis de componentes independientes (ICA)

Para la separación del LFP en los componentes independientes que lo constituyen se llevó a cabo un análisis de componentes independientes o ICA (por sus siglas en inglés: *Independent Component Analysis*). El ICA es una técnica de separación ciega de fuentes empleada ampliamente en diversos campos (Makeig et al., 1997; Choi et al., 2005; Hutchison et al., 2010). La aplicación del ICA espacial a registros intracraneales de LFP obtenidos con dispositivos multielectrodos de alta densidad en estructuras laminares (Makarov et al., 2010) permite el estudio de la actividad de poblaciones neuronales con precisión subcelular (Korovaichuk et al., 2010), aunque también se ha mostrado eficiente en regiones complejas y glomerulares (Makarova et al., 2014). La aproximación del ICA asume que las fuentes que contribuyen al LFP son inmóviles en el espacio y se superponen de forma lineal tal y como ocurre para las corrientes sinápticas subumbriles (Nunez y Srinivasan, 2006). Tanto los detalles

del procedimiento como la validación en el uso de LFP han sido descritos previamente (Makarov et al., 2010; Makarova et al., 2011; Fernández-Ruiz et al., 2012a; Makarova et al., 2014). Brevemente, el registro de M señales simultáneas de LFP (las señales captadas por los distintos electrodos) en distintas posiciones puede ser representada como la suma de N fuentes de actividad neuronal (o componentes independientes o generadores de LFP):

$$LFP_m(t) = \sum_{n=1}^M V_{mn} s_n(t), \quad m = 1, 2, \dots, M \quad (13)$$

donde $\{V_{mn}\}$ es la matriz de mezcla compuesta por las distribuciones espaciales (o perfil de voltaje o perfil de carga) de todos los generadores de LFP y $s_n(t)$ es la evolución temporal del generador de LFP n -ésimo. Así, el LFP registrado en el electrodo m -ésimo es una mezcla lineal de la actividad eléctrica de distintos generadores de LFP independientes. Una vez extraído del LFP, cada generador de LFP puede ser analizado independientemente mediante la reconstrucción de un LFP virtual ($v_n(t)$) producido por el generador en cuestión:

$$v_n(t) = V_n s_n(t) \quad (14)$$

En este estudio utilizamos el algoritmo KDICA (*Kernel Density ICA*; Chen, 2006). El rendimiento de ICA puede diferir dependiendo de la estructura temporal del LFP y del grado de solapamiento de las señales originales. Generalmente, en el hipocampo, se obtienen unos pocos componentes independientes (entre 4 y 7 de un máximo de 32 limitado por el número de electrodos) con una varianza significativa y una distribución espacial de voltajes diferenciables (Korovaichuk et al., 2010; Benito et al., 2014). Esto permite optimizar el análisis mediante una reducción dimensional previa, utilizando análisis de componentes principales o PCA (por sus siglas en inglés: *Principal Component Analysis*), que disminuye la presencia de generadores débiles y ruidosos (Makarova et al., 2011). Además, el PCA estabiliza y acelera la convergencia del algoritmo de ICA (Makarov et al., 2010). En la reducción dimensional se mantiene siempre el 99% de la varianza original del LFP, desechando los componentes cuya varianza es mínima. La precisión temporal y espacial de los generadores de LFP puede incrementarse mediante la aplicación de estímulos eléctricos mínimos de vías específicas que aumenten puntualmente la actividad de un generador concreto (Korovaichuk et al., 2010), o mediante el análisis de un subconjunto de canales que maximicen la varianza relativa de un generador (apropiado para generadores débiles; Benito et al., 2014).

La eficiencia del ICA para extraer con precisión los generadores del LFP dependen de la contribución relativa de éstos al LFP (Makarova et al., 2011). Por tanto, al aplicar ICA a LFPs artificiales primero se ajustó la varianza de los generadores de LFP conocidos a valores realistas

(Korovaichuk et al., 2010; Benito et al., 2014). Esto se realizó mediante la adición de canales que simulaban actividad del LFP con actividad no correlacionada, permitiendo así el balance de la cantidad de varianza requerida en el generador de LFP.

2.3.2. Análisis de fuentes de corrientes (CSD)

La localización de las fuentes de corrientes que subyacen al LFP fue obtenida mediante el análisis de fuentes de corriente o CSD (por sus siglas en inglés: *Current Source Density*). El CSD determina la magnitud y localización de la corriente transmembrana neta generada por los elementos neuronales en una pequeña región del tejido (Freeman y Nicholson, 1975; Rappelsberger et al., 1981). Mediante este análisis se obtiene la distribución espacial y temporal de las fuentes y sumideros, que se corresponden con corrientes de entrada y salida en el espacio extracelular (e inversamente desde el punto de vista de las neuronas), respectivamente. Asumiendo que el medio extracelular tiene conductividad constante σ se tiene que:

$$CSD(t, \vec{r}) = -\sigma \nabla^2 LFP(t, \vec{r}) \quad (15)$$

El hecho de que la variación del LFP se produzca principalmente en el eje las células principales nos permite utilizar una aproximación unidimensional para el cálculo de la segunda derivada en el espacio, estimando el CSD a partir de las distribuciones de voltaje a lo largo del eje celular (Herreras, 1990):

$$CSD_m(t) \approx -\frac{\sigma}{h^2} (LFP_{m-1}(t) - LFP_m(t) + LFP_{m+1}(t)) \quad (16)$$

donde m denota el electrodo y h la distancia entre electrodos. Hay que tener presente que existen diversos factores que pueden introducir errores en la estimación de las corrientes tales como la cancelación de corrientes de distinto origen o la heterogeneidad en la resistividad del tejido (López-Aguado et al., 2001).

2.3.3. Extracción y clasificación de espigas de neuronas individuales

Los trenes de espigas de neuronas individuales fueron obtenidos a partir de registros de LFP sin filtrar de las regiones CA1 y CA3 mediante el uso del algoritmo *wavelet-enhanced spike sorting* y métodos de CSD locales (Pavlov et al., 2006). Las neuronas individuales fueron clasificadas en dos subclases, células piramidales e interneuronas, en base a la localización del electrodo de registro y criterios electrofisiológicos estándar adicionales (Csicsvari et al., 1998).

2.3.4. Detección de eventos sinápticos poblacionales en el LFP

La actividad basal del generador de Schaffer (LFP producido por la aferencia sináptica de la región CA3 a CA1 a través de los colaterales de Schaffer) está compuesta por eventos excitadores o micro-campos de potenciales postsinápticos excitadores (μ fEPSPs por sus siglas en inglés: *microfield Excitatory Postsynaptic Potentials*) en la frecuencia gamma. Para identificar cada uno de los eventos individualmente utilizamos la transformada wavelet de la evolución temporal del generador de Schaffer en el LFP (Fernández-Ruiz et al., 2012a; Pavlov et al., 2006):

$$W(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int s(t) \Psi\left(\frac{t-b}{a}\right) dt \quad (17)$$

donde Ψ representa el wavelet *Haar mother* (apropiado para la detección de pulsos cortos en una señal), a es la escala temporal y b la localización en el tiempo. Posteriormente se rectifican los coeficientes del wavelet utilizando la ecuación:

$$C(a, b) = \max(-W(a, b), 0) \quad (18)$$

La superficie bidimensional así obtenida describe el ajuste lineal local del LFP específico de Schaffer por la función de tipo pulso (Haar) en la escala a y localización b . Los valores absolutos de $C(a, b)$ en un instante y escala dados se corresponden con transiciones abruptas de tipo pulso en la evolución temporal $s(t)$ del LFP de Schaffer. Por tanto, podemos asociar dichos puntos en el plano (b, a) con eventos del LFP individuales. De esta forma, el máximo local

$$(a, b)_k = \underset{wk}{\operatorname{argmax}}(C(a, b)) \quad (19)$$

define los instantes de tiempo de los μ fEPSPs (dados por $t_k = b_k - ak/2$), su duración (dada por a_k) y su amplitud (dada por $A_k = C(a_k, b_k)$).

Posteriormente, observamos que, debido al solapamiento de eventos sucesivos, se podía estar subestimando la duración y amplitud. Además, el instante de inicio era sólo aproximado, mientras que para el estudio comparativo bilateral se requiere gran precisión de este parámetro. Por tanto, para evaluar la relación entre eventos de los dos hemisferios y el disparo neuronal (ver más abajo) utilizamos un segundo método de detección basado en deconvolución de LFPs. El método asume que la evolución temporal de un generador de LFP $s(t)$ está formada por la suma de K eventos individuales con una forma tipo pulso:

$$s(t) = \sum_{k=1}^K w_k f(t - \tau_k; \delta_k), \quad f(t; \delta) = H(t) \frac{t}{\delta^2} e^{\frac{-t^2}{2\delta^2}} \quad (20)$$

donde w_k , τ_k y δ_k son el peso relativo, el tiempo de inicio y escala temporal del evento k , respectivamente, y $H(t)$ es la función de Heaviside. La estimación del grupo de parámetros (w , τ , δ) se obtuvo a partir de las características de $s(t)$, utilizando el método de maximización de la verosimilitud logarítmica:

$$L = \sum_{n=1}^N \ln \left[\sum_{k=1}^K w_k f(t - \tau_k; \delta_k) \right] + \left(1 - \sum_{k=1}^K w_k \right) \quad (21)$$

donde t_n son las muestras de tiempo. Debido a que la suma de los componentes aparece dentro del logaritmo, no existe solución cerrada para la máxima verosimilitud. Por tanto, para maximizar L utilizamos el algoritmo de expectación-maximización adaptado para la función de verosimilitud dada. Para comenzar el esquema numérico y facilitar la convergencia estimamos los parámetros inicialmente mediante la descomposición wavelet (Hramov et al., 2014).

2.3.5. Coherencia espectral

La coherencia espectral de los cursos temporales de dos generadores fue calculada mediante:

$$C_{xy}(f) = \frac{|P_{xy}(f)|^2}{P_{xx}(f)P_{yy}(f)} \quad (22)$$

donde $\{P_{ij}(f)\}$ es la matriz de densidad de potencia espectral cruzada. Para determinar el nivel de significatividad estadística utilizamos un test de distribuciones surrogadas (Schreiber y Schmitz, 2000). Las series temporales surrogadas fueron obtenidas a partir de las señales originales mediante el barajado de las relaciones de fase, manteniendo intactas las otras características de primer orden. Para cada experimento se generaron 1000 surrogadas y se evaluó la coherencia espectral. Se calculó el nivel de significatividad ($\alpha=0.05$) para cada frecuencia, y toda coherencia superior a dicho valor fue considerada estadísticamente significativa.

2.3.6. Análisis de fase (PLV)

Para evaluar las diferencias de fase entre los cursos temporales de dos generadores distintos de LFP ($\Delta\theta(t) = \theta_2(t) - \theta_1(t)$) se construyeron histogramas con la distribución de probabilidades o PDHs (por sus siglas en inglés: *Probability Distribution Histograms*). Las señales fueron filtradas en gamma (30-60 Hz; Fernández-Ruiz et al., 2012a) y posteriormente se les extrajo la fase mediante la transformada de Hilbert, obteniéndose así la diferencia de fase

que permitía calcular el valor de acoplamiento de fase o PLV (por sus siglas en inglés: *Phase Locking Value*; Lachaux et al., 1999):

$$PLV = \left| \frac{1}{T} \int_0^T e^{i\Delta\theta(t)} dt \right| \quad (23)$$

obteniéndose valores de $PLV=1$ para señales perfectamente sincrónicas y $PLV=0$ para señales totalmente asincrónicas. Para examinar la significatividad estadística del PDH y PLV nos servimos de un test de surrogadas. Para evitar los falsos positivos en el PDH utilizamos una corrección de Bonferroni.

Para estimar la relación de fase entre la fase de un generador de LFP (o de un LFP nativo) y las espigas de neuronas individuales se utilizó la fase obtenida de la misma forma que en el caso anterior y se construyó un histograma con los valores de fase correspondientes a los instantes en que la neurona descarga espigas. Para evaluar la significatividad del acoplamiento fase-disparo utilizamos el Test de Rayleigh ($p < 0.05$) para datos circulares no uniformes.

2.3.7. Potencia

La evolución temporal de la potencia de un generador de LFP (medida en mV^2) fue calculada mediante

$$P(t) = \int H(t - \tau) v^2(\tau) d\tau, \quad H(x) = \begin{cases} 1/\Delta & \text{si } x \in [-\Delta/2, \Delta/2] \\ 0 & \text{si } x \notin [-\Delta/2, \Delta/2] \end{cases} \quad (24)$$

donde $v(t)$ se corresponde con el LFP virtual en el electrodo de máxima potencia y Δ es el tiempo de promediado. Para calcular la potencia media de todo el registro se estableció Δ igual al tiempo total (200 y 2 segundos para LFPs experimentales y simulados, respectivamente).

2.3.8. Sincronización de eventos bilaterales de Schaffer y el disparo de neuronas

Para analizar la relación entre los eventos individuales del generador de Schaffer en ambos hemisferios y el disparo de neuronas se utilizaron dos métodos distintos. Primero, se construyeron comodulogramas con la relación temporal de la latencia del inicio de los eventos de cada hemisferio (ejes de abscisas y ordenadas) con respecto al disparo de las neuronas (tiempo cero), de tal forma que se obtenían histogramas con la densidad de coincidencias de latencias de eventos para cada disparo neuronal. Así, los intervalos más frecuentes para la combinación de eventos del hemisferio derecho o R (por su palabra en inglés: *Right*) e izquierdo o L (por palabra en inglés: *Left*) aparecen representados mediante un código de colores desde la ausencia de eventos (azul) hasta una alta densidad de eventos (rojo). Los valores cercanos a la

diagonal indican que la célula disparó tras la coincidencia de eventos L y R, mientras que la acumulación de eventos paralela a uno de los ejes indica preferencia de disparo con el hemisferio correspondiente. Para establecer un nivel de significatividad se introdujo un modelo probabilístico en el que se eliminó la coincidencia de eventos L y R por azar, obteniéndose así un comodulograma con valores positivos significativos:

$$H_{sig} = H - H_{0.95} \quad (25)$$

Para evaluar el nivel de significatividad $H_{0.95}$ se asumió que los eventos de ambos hemisferios eran generados por un proceso estocástico de Poisson y que la probabilidad conjunta de obtener un evento de cada hemisferio en una ventana temporal Δ podía ser representada por el producto:

$$P = \left(1 - e^{-\frac{N_L \Delta}{T}}\right) \left(1 - e^{-\frac{N_R \Delta}{T}}\right) \quad (26)$$

donde N_L y N_R representaban los números de eventos producidos en el tiempo de observación T . Asumiendo que el número de espigas es $N_s \gg 1$ pero con una tasa de disparo suficientemente baja, se puede escribir la distribución estadística:

$$Y = \text{Bin}(N_s, P) \approx N(PN_s, \sqrt{N_s P(1 - P)}) \quad (27)$$

De esta forma, el umbral para el comodulograma está dado por:

$$H_{1-\alpha} = PN_s + \lambda_{1-\alpha} \sqrt{N_s P(1 - P)} \quad (28)$$

El segundo método utilizado evaluaba la bondad de la correlación del disparo de las neuronas con la presencia de eventos unilaterales o bilaterales, o si existía una independencia entre dichos procesos. Primero, se introdujeron tres procesos puntuales:

$$S_1 = \{t_i\}_1^{n_1}, \quad S_2 = \{t_i\}_1^{n_2}, \quad Q = \{t_i\}_1^{n_3}, \quad (29)$$

Donde S_1 y S_2 se corresponden con los tiempos de inicio de los eventos gamma (R y L) y Q describe los instantes de tiempo en los que dispara la neurona. Para describir los diferentes tipos de coincidencias de eventos se introdujeron los siguientes vectores:

$$[s_1, s_2, q], \quad [s_2, s_1, q], \quad [s_1, \bar{s}_2, q], \quad [s_2, \bar{s}_1, q] \quad (30)$$

El primer vector se corresponde con una situación en la que tras la aparición de un evento S_1 en una ventana temporal W también se produce al menos un evento S_2 y un evento Q . Para el segundo vector, un evento S_2 es seguido de S_1 y Q . El tercer vector indica que tras un evento S_1 aparece un evento Q pero no un evento S_2 . El último vector, se corresponde con eventos de S_2

seguidos de eventos Q pero no de un evento S_i . Los dos primeros vectores describen una situación en la que el disparo de la neurona ha sido provocado por la excitación conjunta de los eventos de ambos hemisferios, mientras que los dos últimos vectores se refieren a efectos unilaterales. Para cada tren de disparos se cuantificó el número de las posibles situaciones (los cuatro vectores) y se estimaron los límites de confianza para la aparición por azar. El límite de confianza fue evaluado como sigue (se describe el cálculo para el primer vector, el resto se obtienen de manera idéntica). Se asumió que los eventos de ambos hemisferios y los disparos neuronales siguen una distribución de Poisson independiente. Entonces la probabilidad de encontrar al menos un evento y un disparo de una ventana de tiempo W tras la aparición de un evento S_i está dada por:

$$p = \left(1 - e^{\left(\frac{-WN_2}{T}\right)}\right) \left(1 - e^{\left(\frac{-WN_s}{T}\right)}\right) \quad (31)$$

Donde T es el tiempo total de análisis y N_2 y N_s se corresponden con el número total de eventos de S_2 y número total de disparos, respectivamente. Entonces, la probabilidad de ocurrencia por azar del primer vector está dada por:

$$p \pm \lambda_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{p(1-p)}{N_1}} \quad (32)$$

donde N_1 es el número total de eventos S_1 . Los valores obtenidos fuera de estos límites fueron considerados estadísticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1 DETERMINACIÓN DE UNA LÍNEA BASE EN LAS OSCILACIONES DEL LFP

El estudio de oscilaciones del LFP espontáneas requiere de la resolución secuencial de dos aspectos cruciales:

- 1) Separación de las distintas aferencias que contribuyen a la señal mezclada para establecer los dominios sinápticos y la evolución temporal específica de cada una.
- 2) Estimación de la línea base de referencia de la oscilación perdida en los registros acoplados en AC, para obtener la polaridad correcta de la aferencia.

La separación de las distintas aferencias (punto 1) ya ha sido resuelto previamente mediante la aplicación de análisis de componentes independientes (Makarov et al., 2010; Makarova et al., 2011), por lo que sólo se hará especial énfasis en la resolución del problema de la línea base (punto 2). En la Figura 9A se esquematiza el origen del problema mediante la simulación numérica del LFP a partir de corrientes sinápticas. Se simuló una entrada excitadora en el estrato de dendritas apicales en un modelo de neurona piramidal. Tanto las sinapsis inhibitoras como excitadoras producen corrientes transmembrana que entran y salen de la célula por dominios discretos abarcando toda la anatomía neuronal. A escala poblacional, los flujos de corriente aparecieron macroscópicamente segregados en distintos estratos que se corresponden con dominios homólogos: activos (corrientes sinápticas) y pasivos (corrientes de retorno). El LFP correspondiente a la población tuvo el mismo patrón temporal de las corrientes sinápticas. Sin embargo, el patrón espacial difirió. Las oscilaciones presentaron potenciales positivos y negativos en distintos dominios, incluso en regiones equidistantes de la zona activa. Por tanto, existe una incertidumbre al inferir *a priori* la localización y polaridad de corrientes sinápticas.

En los registros experimentales acoplados en AC la situación se complica. El filtrado de la señal (generalmente >0.1 Hz) elimina casi por completo los componentes ultralentos y el DC, cuya distribución espacial podría haber servido de referencia. La arbitrariedad en la asignación de polaridad y naturaleza química dificulta la correcta interpretación del LFP. En la figura 6 se muestra un registro estándar en AC con un multielectrodo lineal abarcando los estratos de la región CA1 del hipocampo. En la zona de las dendritas apicales donde llegan los colaterales de

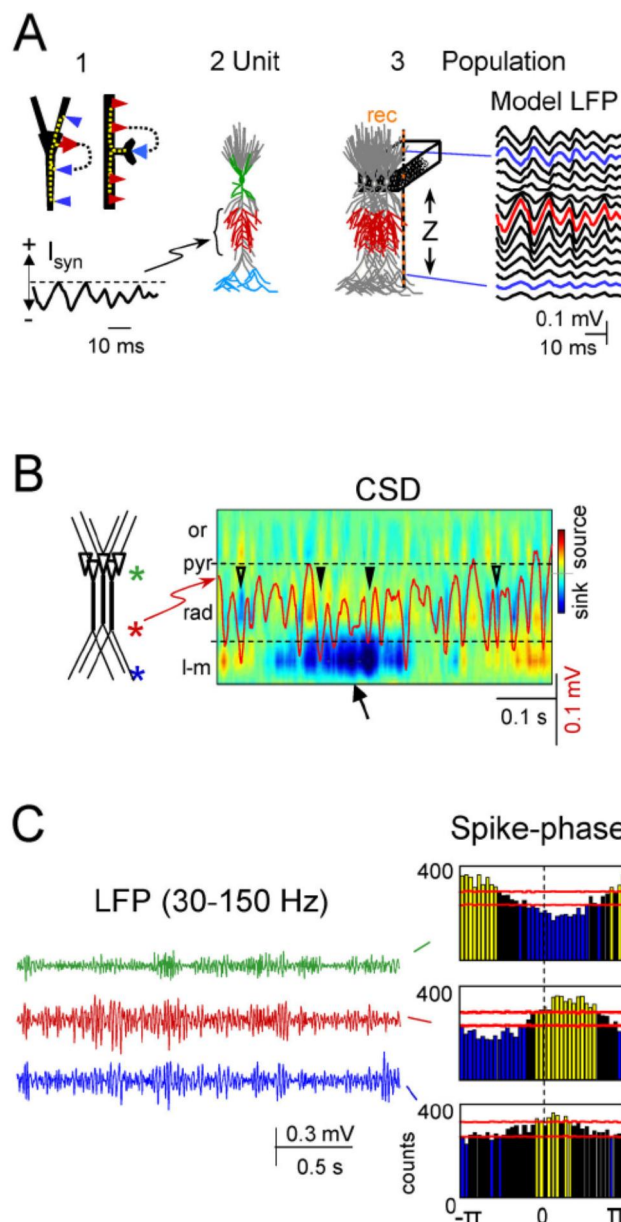


Figura 9. Ilustración del problema y limitaciones en la interpretación de las oscilaciones de LFP. **A)** Modelo de generación de LFP desde células individuales hasta agregados. (1) Tanto las corrientes inhibitoras (flecha roja en el soma) como las corrientes excitadoras (flecha azul en las dendritas) producen bucles de corriente de entrada y salida a lo largo de toda la célula. (2-3) Se muestra el escalado de las corrientes desde células individuales hasta el LFP producido por una población neuronal utilizando un modelo realista de células piramidales de CA1. La célula piramidal fue inyectada con corrientes excitadoras rítmicas (I_{syn}) en las dendritas apicales, y se estimaron las corrientes a lo largo de todo el eje celular. La compleja morfología de las células individuales produjo una distribución de LFPs asimétrica. **B)** Se muestra el LFP registrado en el *stratum radiatum* (línea roja) superimpuesto al mapa espacio-temporal de corrientes (CSD). Véase la variabilidad y poca coincidencia de las corrientes y los eventos gamma (puntas de flecha) en el dominio sináptico de Schaffer (entre las líneas discontinuas), debido a la presencia de corrientes de alta intensidad en otros dominios (flecha). Or: *stratum oriens*, pyr: *stratum pyramidale*, rad: *stratum radiatum*, l-m: *stratum lacunosum-moleculare*. **C)** Se muestran diferentes histogramas del disparo de una interneurona de CA1 con respecto a la fase de LFPs registrados en distintas posiciones (asteriscos en B). Las líneas rojas horizontales indican los límites de confianza: solo las barras amarillas y azules muestran valores significativos. (Modificado de Martín-Vázquez et al., 2013).

Schaffer (*stratum radiatum*) se observaron oscilaciones gamma de pequeña amplitud de forma estable. Sin embargo, al estimar las corrientes mediante la aplicación del CSD, las oscilaciones variaron en amplitud e incluso en la polaridad de las corrientes estimadas en la banda de Schaffer (Fig. 9B). En algunos casos, se perdió el sumidero esperado, e incluso se observó una fuente asociada a las oscilaciones. Esta disparidad entre el LFP y el CSD en un punto determinado del espacio se debió a la presencia de corrientes en otros estratos (como puede ser un fuerte sumidero en el *stratum lacunosum-moleculare*), afectando a la intensidad y polaridad de las corrientes netas para cada oscilación individual en el *stratum radiatum*. Además, este efecto dificultó la interpretación del análisis de fase del disparo de neuronas individuales con respecto al LFP, ya que difiere según la región en la que se obtuvo el LFP, lo que impide la determinación de causalidad, esto es, de si el disparo de la neurona fue pre- o postsináptica a las fluctuaciones o ciclos del LFP (Fig. 9C).

Para evitar los problemas mencionados anteriormente proponemos un método para hacer un uso más eficiente de la información registrada y recuperar información que había sido perdida o había quedado oculta. En la Figura 10 se ilustra dicho proceso, que comienza con la generación del LFP macroscópico a partir de las corrientes individuales y donde se puede apreciar cómo se distorsiona la señal al ser captada por un sistema acoplado en AC, de manera que la amplitud de los potenciales DC eliminados difiere en cada punto dependiendo de la potencia de la oscilación original en cada posición. Los pasos a seguir son los siguientes (correspondientes al bloque 3 de la Figura 10):

- 1) Obtener registros simultáneos del LFP en distintos puntos a lo largo del eje principal de las células piramidales de CA1.
- 2) Separar las contribuciones específicas de las distintas vías mediante el procesamiento matemático del LFP que incluye el uso de ICA (Korovaichuk et al., 2010; Makarov et al., 2010; Makarova et al., 2011).
- 3) Estimar los dominios dendríticos de las corrientes transmembrana de la actividad oscilatoria aplicando el análisis de CSD al LFP reconstruido de la vía específica en cuestión.
- 4) Identificar el dominio sináptico (activo) y su naturaleza química (excitadora o inhibidora) mediante la microinyección localizada de bloqueantes de neurotransmisores.
- 5) Rectificar los mapas de CSD introduciendo un *offset* que imponga la polaridad de la corriente determinada en el dominio activo.

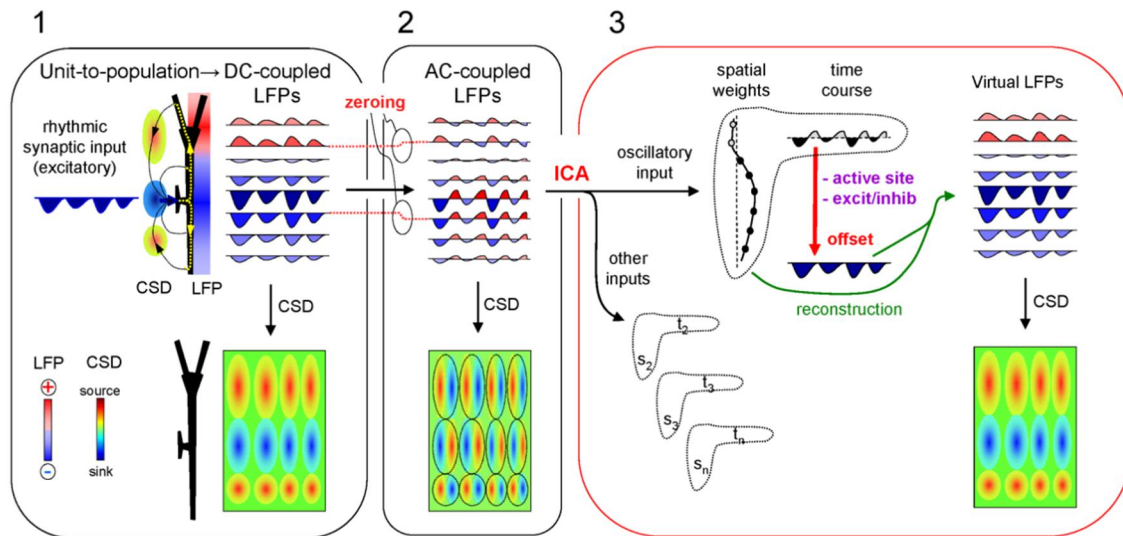


Figura 10. Resumen del procedimiento llevado a cabo. (1) Ilustra la relación existente entre las corrientes en una célula individual y el LFP registrado (acoplado en DC) a nivel macroscópico. Una entrada excitadora rítmica en las dendritas apicales produce un sumidero de corriente local rodeado de fuentes de corriente distales (CSD). Dichas corrientes producen un perfil de LFP de amplitud y polaridad variable en los distintos puntos de la célula. Al estimar las corrientes mediante CSD se obtiene un perfil de sumideros y fuentes con intensidades y localizaciones correctas. (2) Se ilustra el efecto de los registros acoplados en AC. Cada canal sufre una modificación (*offset*) proporcional a la potencia de la señal (línea roja discontinua) y los eventos oscilatorios son transformados en una secuencia bifásica (positiva/negativa) en todos los canales. Al estimar las corrientes mediante el análisis de CSD a perfiles de potenciales rectificadas en AC se obtiene un perfil de secuencias espurias de fuentes y sumideros. Cada ciclo de la oscilación original (óvalo discontinuo) es transformado en un par sumidero/fuente en el que se pierde la referencia temporal del inicio del evento original. (3) Ilustra el proceso de rectificación. En primer lugar se descompone la señal original en los distintos generadores específicos de vía (mediante la aplicación de ICA al LFP), cada uno con un curso temporal y distribución espacial específica. La determinación experimental de la naturaleza química excitadora/inhibidora del dominio sináptico activo permite añadir un *offset* en la amplitud de la evolución temporal de manera que la reconstrucción virtual del LFP usando la distribución espacial del componente previamente extraído con el ICA se reproducen eventos de polaridad única y correcta en cada canal. Al estimar las corrientes sobre el LFP virtual mediante CSD se recupera un perfil correcto similar al original. (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2013).

Para describir y testar el método, y con propósitos ilustrativos, seleccionamos la entrada espontánea de las células piramidales de la región de CA3 a las células piramidales de la región de CA1 a través de los colaterales de Schaffer, ignorando *a priori* el conocimiento de su naturaleza excitadora. En animales anestesiados, dicha entrada consta de una secuencia relativamente estable de eventos con frecuencia gamma (Fernández-Ruiz et al., 2012a,b). Para comprobar matemáticamente la solidez biofísica de los distintos pasos, se aplicaron en paralelo en LFPs reales y LFPs simulados de forma numérica, comparándose los efectos en ambos.

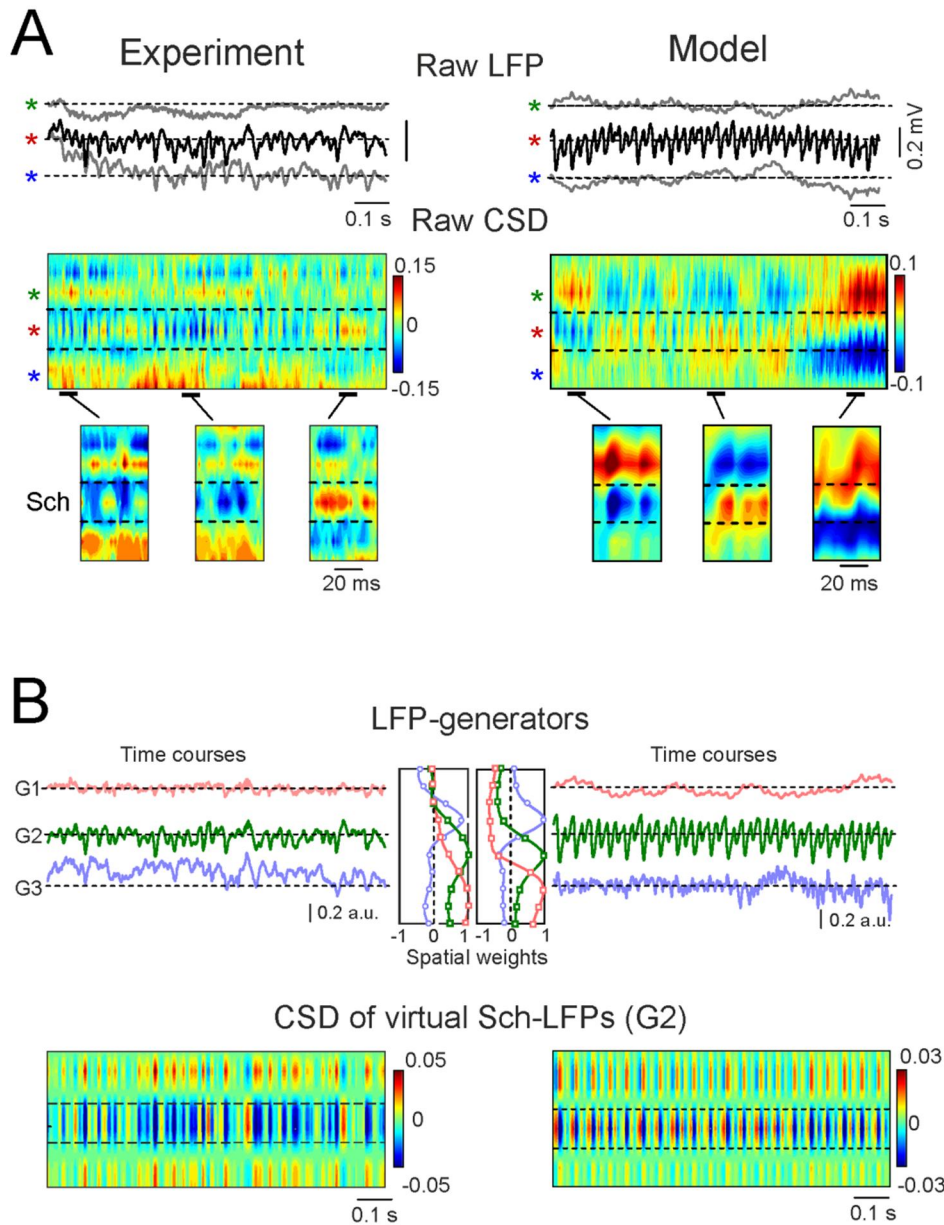


Figura 11. Extracción de las corrientes específicas de vía que producen la oscilación del LFP. A) En la columna izquierda se muestran los LFPs nativos registrados en modo AC en distintos dominios a lo largo del eje de las células piramidales (asteriscos correspondientes a la Figura 9B). Los LFPs modelados (columna derecha) fueron filtrados (>0.1 Hz) para simular un registro acoplado en AC. Al estimar las corrientes mediante análisis de CSD se obtuvo un patrón de mezcla espacio-temporal de fuentes y sumideros con estratificación pobre. Los segmentos amplificados muestran que en el dominio sináptico de Schaffer los eventos de gamma pudieron presentarse asociados con fuentes o con sumideros. **B)** Mediante la aplicación de ICA al perfil de LFPs se obtuvieron tres componentes específicos de vía (generadores de LFP; G1-G3) con sus respectivas evoluciones temporales y distribuciones espaciales. En los paneles inferiores se muestran los mapas espacio-temporales de corrientes obtenidos por el análisis de CSD aplicado al LFP virtual reconstruido para la entrada de Schaffer (G2), en el que se observan secuencias de fuentes/sumideros con puntos de reversión estables (líneas discontinuas). El modelo confirmó que dichos límites se corresponden con la frontera macroscópica entre los dominios activos y pasivos de la entrada sináptica. Se muestran en paralelo los análisis realizados de datos obtenidos experimentalmente (izquierda) y computacionalmente (derecha). (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2013).

3.1.1. El CSD de un perfil de LFP específico de vía exhibe dominios espaciales estables

Aunque la activación de una vía genera fuentes y sumideros de configuración estratificada en dominios específicos de la célula (Fernández-Ruiz et al., 2102a), ésta deja de ser evidente durante actividad espontánea debido a la activación simultánea de múltiples vías (Fig. 11A). Mediante el modelo se confirmó que la mezcla compleja de sumideros y fuentes de corriente distribuidas por todo el perfil se debe al solapamiento temporal de la activación de múltiples entradas sinápticas con activación temporal e intensidad propias en distintos puntos de la morfología dendrítica.

Para identificar la contribución específica al LFP de las distintas vías sinápticas se aplicó el ICA a largos periodos de registro. Se obtuvieron tres componentes (o generadores de LFP) en la región CA1 que fueron estables entre experimentos, tal y como se había observado en otros estudios (Fig. 11B; Korovaichuk et al., 2010; Benito et al., 2014; Schomburg et al., 2014). Se seleccionó la entrada sináptica correspondiente a los colaterales de Schaffer desde CA3 a CA1 (G2 en la Figura 11B), que genera oscilaciones gamma producidas por las corrientes postsinápticas en las células piramidales de CA1 provocadas por el disparo sincrónico de los clústeres de células piramidales de CA3. El LFP modelo se generó con una actividad gamma de patrón mucho más regular para simplificar y favorecer la visualización de las transformaciones.

Para estudiar específicamente la actividad en la vía de Schaffer se reconstruyó su LFP virtual, que representa la señal que hubiese generado la vía de Schaffer a lo largo del perfil de CA1 si hubiese estado activa sola e independientemente de la actividad del resto de entradas sinápticas convergentes (otros generadores). A diferencia del LFP nativo sin procesar, el LFP reconstruido (en adelante denominado Sch-LFP) presentó una coherencia absoluta en todos los puntos del espacio, siendo su amplitud proporcional en todo momento. Al aplicar el CSD al perfil de Sch-LFPs se observó una mezcla de fuentes y sumideros alternantes pero con una configuración espacial perfectamente estratificada. Este resultado fue reproducido idénticamente en los LFP modelados que habían sido previamente filtrados en AC, demostrando que la pérdida de la línea base así ocasionada explica la alternancia en la polaridad de las corrientes, y que la estratificación espacial de corrientes refleja la separación entre los dominios dendríticos activos y pasivos.

3.1.2. Identificación del dominio sináptico

La identificación del dominio activo y la naturaleza inhibidora/excitadora de las corrientes sinápticas se basó en la asunción de que un solo tipo de bloqueante de neurotransmisor debe ejercer un efecto cuando es aplicado en el dominio activo de una vía particular, ya que es donde se encuentran sus receptores postsinápticos. En experimentos distintos, se inyectó DNQX o

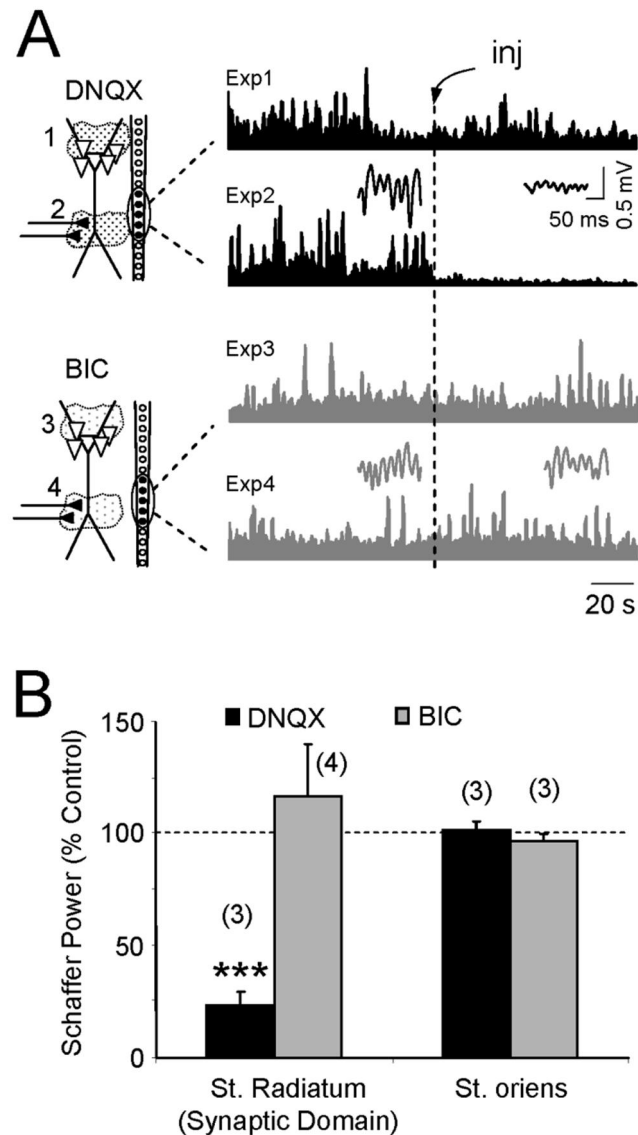


Figura 12. Determinación experimental de la localización del dominio sináptico activo y de su naturaleza química. **A)** Se inyectó localmente DNQX o bicuculina, en el *stratum oriens/pyramidale* (Experimentos 1 y 3) y *stratum radiatum* (Experimentos 2 y 4). Se muestra la evolución temporal de la potencia del generador de Schaffer en control y tras la inyección (Inj). Los fragmentos ampliados muestran LFPs virtuales del generador de Schaffer en cada una de las condiciones. Las inyecciones 1-4 fueron realizadas en distintos instantes de tiempo. **B)** Muestra los datos poblacionales de la disminución de la potencia del generador de Schaffer con respecto al control. El número sobre los histogramas representa el número de animales utilizados. *** $p < 0.001$, t de Student. (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2013).

bicuculina (BIC) para bloquear los receptores de Glutamato o GABA_A, respectivamente, en dos de los dominios de corrientes hallados anteriormente mediante el análisis de CSD al LFP reconstruido (*stratum oriens/pyramidale* y *stratum radiatum*). En dichos dominios se producen fuentes de corriente de polaridad opuesta, y por tanto unos son activos y otros pasivos de forma excluyente, aunque se desconoce *a priori* qué propiedades tiene cada dominio. La inyección del

bloqueante excitador DNQX en la región *stratum pyramidale/stratum oriens* no tuvo ningún efecto sobre el LFP de Schaffer, así como la inyección de BIC en el *stratum pyramidale/stratum oriens* y el *stratum radiatum* (Fig 12A; Experimentos 1, 3 y 4). Sin embargo, la inyección de DNQX en el *stratum radiatum* abolió completamente el LFP específico de Schaffer (Fig 12A; Experimento 2). Estos resultados demostraron que la zona sináptica activa está localizada en el *stratum radiatum* y que es de naturaleza excitadora (Fig 12B).

3.1.3. Rectificación de las corrientes sinápticas

Las corrientes extracelulares localizadas en el dominio sináptico tienen una polaridad única y de signo opuesto a las existentes en los dominios pasivos circundantes (Nunez y Srinivasan, 2006). En los experimentos farmacológicos se demostró que la entrada de Schaffer era excitadora, por lo que en su zona activa sólo pueden existir sumideros de corriente (corrientes de entrada en las células) asociados al LFP generado por dicha entrada. Con esta imposición en mente se rectificó la evolución temporal del generador de LFP de Schaffer aplicando un *offset* de manera que se mantuviese la polaridad negativa de la señal en el dominio activo (Fig. 13A). Los valores del *offset* para una vía específica deben ser proporcionales en los distintos puntos de registro en todo momento, reproduciendo el mismo perfil espacial que el generador de LFP acoplado en AC (Fig. 13B). Es de esperar, que en el LFP nativo los valores del *offset* real difieran de forma compleja en los distintos puntos debido a la confluencia de distintas vías. Para el caso del estudio de la vía de Schaffer, la reconstrucción del LFP virtual utilizando la evolución temporal rectificada y el perfil espacial del generador obtenido en AC, introduce el *offset* necesario en cada canal. De esta forma, se obtuvieron sumideros únicamente en la zona sináptica y fuentes tan sólo en las zonas circundantes (Fig. 13B). Como se puede observar, desapareció la alternancia en la polaridad de las corrientes, en contraste con la señal previa a la rectificación.

La rectificación de la actividad específica de vía en su componente exclusivamente temporal (desprovisto de espacialidad) provocó una rectificación de la amplitud en los LFPs virtuales poco intuitiva que fue dependiente del tiempo y modificó sustancialmente las propiedades de la oscilación. La distribución de los eventos individuales de las oscilaciones gamma había mostrado que, medidos desde la línea base en AC (de valor medio cero), existían eventos de ambas polaridades (Fig. 13C1). Dichos eventos alcanzaron una amplitud promedio de 0.1 mV en valor absoluto y una duración de 13 ms. Sin embargo, tras la rectificación, todos los eventos tenían polaridad negativa, siendo su amplitud media -0.4 mV y su duración 15 ms (Fig. 13C2). En las simulaciones numéricas se obtuvieron resultados similares.

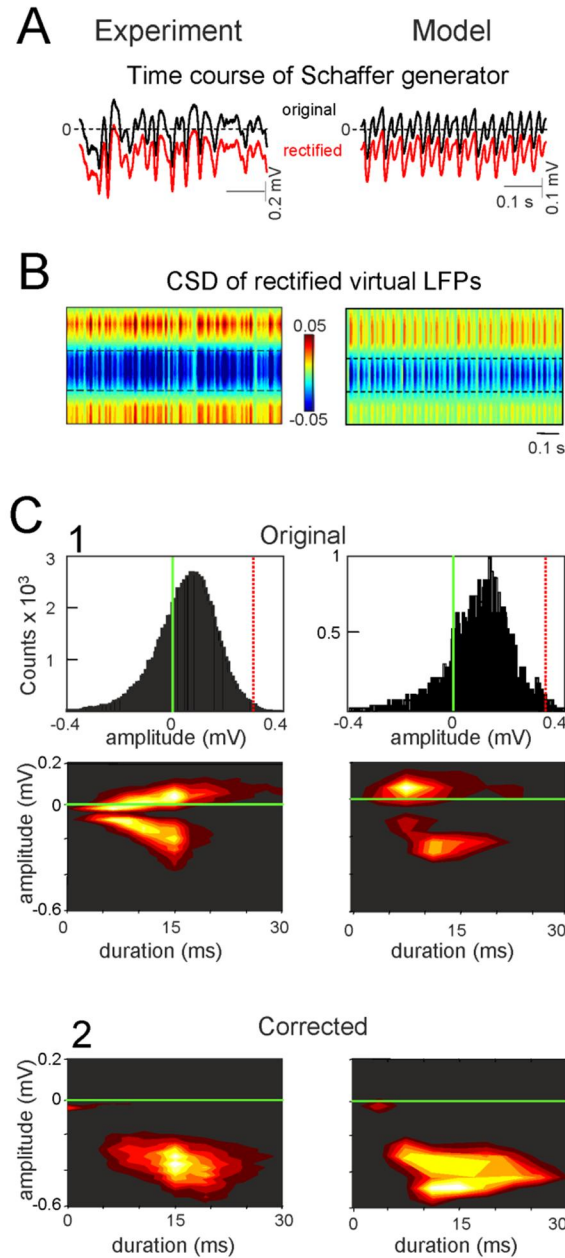


Figura 13. La rectificación de la línea base de la evolución temporal del LFP reconstruido elimina la alternancia de corrientes en el análisis de CSD. **A)** Se añadió un *offset* constante a la evolución temporal desprovista de dimensión espacial (trazo negro) para obtener actividad de polaridad única (trazo rojo). La dirección y amplitud de dicho *offset* se determinó experimentalmente (Figura 12). De esta forma se obtuvo un LFP reconstruido en el que se recuperó la proporcionalidad espacial de la señal oscilatoria. **B)** Al estimar las corrientes mediante CSD del LFP reconstruido con el DC original de la oscilación, se obtuvieron bandas claras de sumideros en el dominio sináptico de la entrada de Schaffer y fuentes en los *strata pyramidale* y *lacunosum-moleculare*. **C)** Muestra la estimación de las amplitudes y duraciones de los eventos oscilatorios individuales antes (1) y después (2) de la rectificación en fragmentos de tiempo largos (600 y 450 segundos en registros experimentales y simulaciones numéricas, respectivamente). La distribución de amplitudes de los eventos del generador de Schaffer reveló la existencia de eventos positivos y negativos antes de la rectificación, y su polaridad única posterior. En el densitograma se muestra la acumulación de eventos con respecto a la amplitud y duración. Se observa una duración mayor de los eventos rectificadas. Los datos pertenecen a un experimento representativo. Se muestra en paralelo los análisis realizados de datos obtenidos experimental (izquierda) y computacionalmente (derecha). (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2013).

3.1.4. Clasificación pre- o postsináptica de neuronas con respecto al LFP

Una vez conocida la polaridad de las corrientes sinápticas de la vía en estudio, el procedimiento descrito permite establecer el punto de referencia temporal con el que fijar el comienzo de cada evento o ciclo de la oscilación gamma, esto es, los instantes en los que se producen paquetes de excitación sináptica causados por la aferencia de CA3 y que despolarizan las células de CA1 (Fig. 14A). De esta manera se puede estudiar con mayor precisión la relación temporal del disparo neuronal con los LFPs registrados simultáneamente, para lo cual se construyeron histogramas de los disparos de distintas neuronas de CA1 (postsinápticas) y CA3 (presinápticas) con respecto a LFPs del *stratum radiatum* (tanto nativos como específicos de la vía de Schaffer; Fig. 14B).

Las células piramidales de CA3 (28 de 29 células piramidales; 15 minutos de registro; $n=11$ ratas) mostraron un promediado significativo del LFP nativo con respecto al disparo neuronal, lo que indicó la existencia de una asociación entre el LFP de CA1 y los disparos generados por las células piramidales de CA3 (Fig. 14B1). También se observó una correlación significativa entre estas células y la fase del LFP nativo del *stratum radiatum* ($7\pm 3^\circ$), que no se mantuvo al realizar el mismo análisis contra el LFP del *stratum pyramidale* correspondiente a membranas con corrientes de retorno, posiblemente debido a la confluencia con otras aferencias (Fig. 14B1). En el caso del LFP virtual reconstruido para la entrada de Schaffer se obtuvieron relaciones de fase significativas tanto en el *stratum radiatum* ($4\pm 3^\circ$) como el *pyramidale* ($191\pm 3^\circ$), tal y como cabría esperar, pues si bien presentan distinta amplitud son registros del mismo campo eléctrico realizados en sitios distintos y por tanto proporcionales, y en estos dos puntos en concreto con polaridad inversa. Estas correlaciones experimentales fueron corroboradas en las simulaciones numéricas (Fig. 14B2). La ligera desviación de la fase con respecto a los datos experimentales se debió a que el instante que se tomó como ocurrencia del disparo de las células de CA3 se ajustó al instante de apertura de canales sinápticos en la región CA1 sin considerar latencia alguna por propagación axonal del potencial de acción.

Las interneuronas registradas a lo largo del eje piramidal de CA1 presentaron un comportamiento muy heterogéneo, como cabía esperar de la diversidad de subtipos funcionales en estas neuronas (Fig. 14C). De las 24 interneuronas registradas únicamente 9 tuvieron un comportamiento significativo con respecto al LFP virtual de Schaffer (tanto el promediado del LFP como la relación de fase). Sin embargo, en los casos en los que las interneuronas exhibieron valores significativos, la fase preferente fue distinta a la de las células piramidales de CA3, y se correspondió con instantes posteriores al inicio de cada ciclo de la oscilación. Mientras que las células piramidales de CA3 dispararon preferentemente en torno a 0° las interneuronas de CA1 lo hicieron con valores de fase más positivos, lo que representa disparos

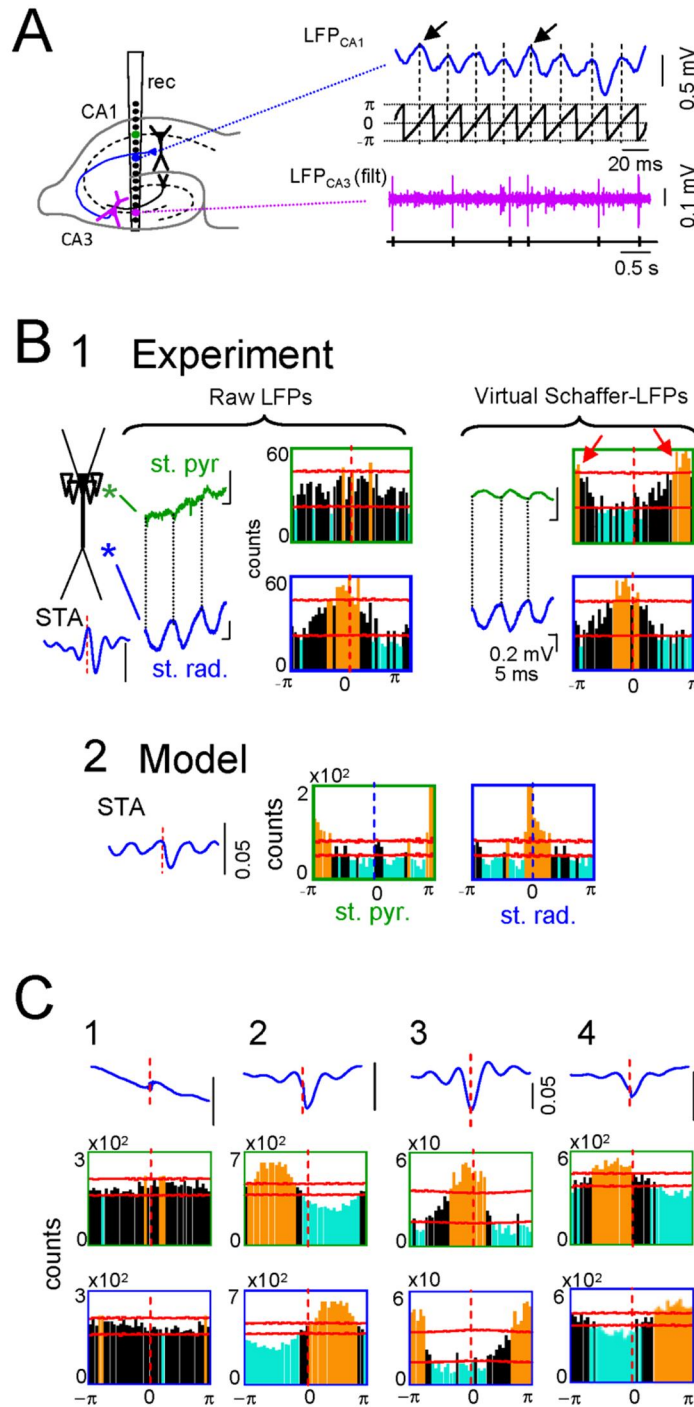


Figura 14. El establecimiento del inicio de cada ciclo individual de la oscilación gamma permite discriminar neuronas presinápticas de postsinápticas con respecto al LFP. A) Muestra el esquema de la sinapsis CA3-CA1 y la disposición del electrodo de registro abarcando ambas regiones. El instante de inicio de cada evento (línea discontinua) se corresponde con el cero de la fase (trazo negro) extraída a partir del LFP reconstruido en el *stratum radiatum* del generador de Schaffer (trazo azul). También se obtienen los instantes de tiempo de los disparos de las células piramidales de CA3 (el trazo morado representa el LFP de CA3 filtrado, y en negro los eventos puntuales). **B)** (1) Se obtuvo el histograma de fases de las células piramidales de CA3 identificadas electrofisiológicamente con respecto al LFP nativo y reconstruido en las posiciones de *stratum radiatum* (azul) y *pyramidale* (verde). El acoplamiento de fase fue significativo en todos los casos salvo en el del LFP crudo de *stratum pyramidale*. (2) Se obtuvieron resultados similares en las simulaciones numéricas. **C)** Las interneuronas de la región de CA1 mostraron histogramas de fase muy variables, debido a la presencia de distintos tipos neuronales, pero en todos los casos ($n=24$) fueron diferentes de los obtenidos para las células piramidales de CA3. (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2013).

postsinápticos con respecto al LFP específico de Schaffer. La diferencia de fases entre las propias interneuronas se puede explicar por el carácter mono- o polisináptico, o bien por las características de integración sináptica de cada tipo interneuronal que les hace disparar a distinta latencia frente a una misma entrada sináptica.

3.2 UNA ENTRADA COMÚN DESDE CA3 PRODUCE LFPs DIVERSOS EN DISTINTAS ESTRUCTURAS DIANA

El conocimiento preciso de los eventos producidos en las células piramidales de CA1 por la entrada sináptica de las células piramidales de CA3 nos permite disponer de una lectura de la actividad espontánea de la población neuronal de estas últimas. El hecho de que el axón de las células piramidales de CA3 se ramifique, enviando a distintas regiones el mismo patrón temporal de actividad, supone un banco de pruebas inmejorable para monitorizar cómo la citoarquitectura de distintas dianas, y otros factores locales, modulan la producción de LFPs. En el siguiente estudio se caracterizaron los generadores de LFP producidos por la entrada de CA3 a las regiones CA1 ipsi- y contralateral, al Septum Lateral y a la propia CA3 a través de colaterales recurrentes. Las distintas regiones estudiadas tienen propiedades anatómicas y funcionales muy distintas y su estudio requirió diferentes aproximaciones técnicas, por lo que los resultados sólo se presentan de forma comparada en aquellos casos en los que se pudo utilizar una metodología común.

3.2.1. Estudio de los potenciales provocados en distintas regiones tras la estimulación eléctrica de la región de CA3

En primer lugar se evaluó la entrada monosináptica efectiva desde CA3 a las distintas regiones (CA1 en ambos hipocampus y LS ipsilateral) mediante estimulación eléctrica. Con el fin de reducir en lo posible la activación polisináptica, que podría generar potenciales en poblaciones no directamente contactadas por la región CA3, se utilizó una intensidad (80-150 μ A) que no produjo salida en la diana de la región CA1, esto es, que permaneció subumbral para la espiga poblacional. Se comenzó estudiando los potenciales provocados en las distintas regiones (Fig. 8) por estimulación de la región CA3b del hipocampo izquierdo, registrándose los perfiles espaciales respectivos y midiéndose las amplitudes relativas de los potenciales postsinápticos de campo excitadores (fEPSPs). Los fEPSPs producidos en las regiones de CA1 ipsi- y contralateral (denominados Schaffer [CA1_{Sch}] y Comisural [CA1_{Comm}], respectivamente; Fig. 15A) han sido descritos previamente y presentan perfiles espaciales de potencial y corriente característicos (McNaughton y Miller, 1986; Herreras, 1900; Leung et al., 2008). Los

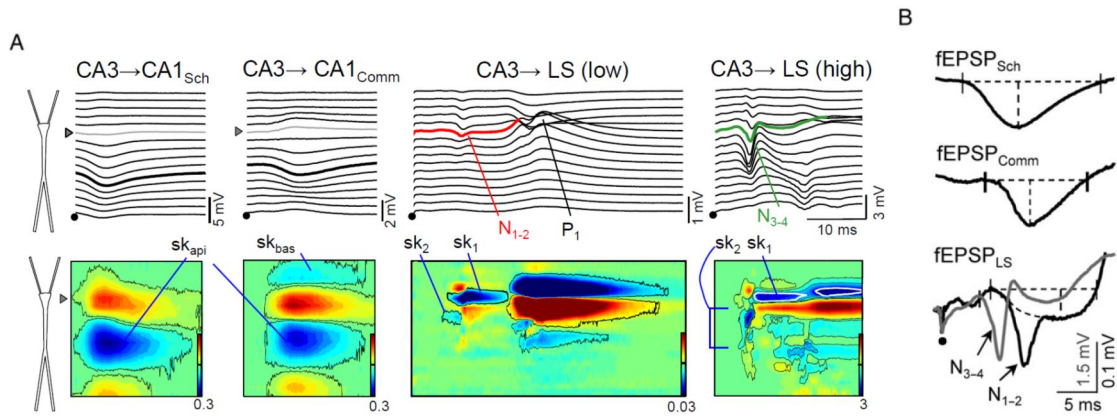


Figura 15. Potenciales provocados producidos por las principales regiones a las que sinaptan las células piramidales de CA3. **A)** Perfiles de los LFPs (paneles superiores) y CSDs (paneles inferiores) de los potenciales provocados por estímulos de CA3. Paneles superiores: Las intensidades de los estímulos fueron subumbrales (80 μ A) para las respuestas de CA1 (Schaffer y Comisural) y de 60 μ A y 200 μ A para las respuestas del septum lateral LS_{low} y LS_{high}, respectivamente. En las respuestas de CA1 los trazos grises (triángulos) se corresponden con el LFP de *stratum pyramidale* y los trazos negros gruesos a los LFPs de *stratum radiatum* utilizados para la cuantificación. Los componentes del potencial provocado en el LS están marcados como eventos negativos (N) y positivos (P). Los trazos coloreados de las respuestas N₁₋₂ y N₃₋₄ se corresponden con los fragmentos en (B). Paneles inferiores: En los perfiles de Schaffer y Comisural se indican los sumideros en dendritas apicales (sk_{api}) y, en el caso del comisural, en dendritas basales (sk_{bas}). En el caso del LS, los perfiles de corrientes exhibieron una distribución compleja tanto a baja como a alta intensidad de estímulo (se muestra la variación de los sumideros sk₁ y sk₂). La calibración de sumideros (azul) y fuentes (rojo) está expresada en unidades arbitrarias. **B)** fEPSPs provocados por la estimulación de CA3 en diferentes regiones. En el LS se muestran los fEPSPs a intensidades de estímulos bajas (N₁₋₂; trazo negro) y altas (N₃₋₄; trazo gris). Las líneas discontinuas horizontales y verticales indican la duración y la amplitud cuantificada, respectivamente. El punto negro marca el instante del estímulo eléctrico. (Modificado de Martín-Vázquez et al., 2015).

potenciales provocados en el LS tras estimulación de la fimbria-fórnix han sido estudiados previamente (DeFrance et al., 1973), si bien la activación directa desde la región CA3 no ha sido investigada en detalle. En este estudio, se encontró una respuesta considerablemente más compleja que la descrita anteriormente para la fimbria-fórnix. Particularmente, con estímulos de baja intensidad (<150 μ A), que produjeron fEPSPs sin espiga poblacional en la región CA1, se produjo un complejo de ondas de potencial negativo en el LS (N₁₋₂; trazo rojo; Fig. 15A) que precedió a una onda positiva de mayor amplitud (P₁). Estos potenciales no habían sido descritos previamente. El complejo N₁₋₂ se compone de una negatividad lenta (N₁) y otra más rápida (N₂), y fueron interpretados como un componente sináptico y otro intrínseco, respectivamente, ya que el N₂ se bloqueó tras pulsos condicionados (pares de estímulos a corto intervalo: 20-60 ms) y desapareció durante estimulación repetitiva de moderada frecuencia (> 1 Hz). El complejo N₁₋₂ exhibió un curso temporal similar a otro complejo negativo N₃₋₄ que se desarrolló únicamente con estímulos de intensidad mayor, aunque sus perfiles espaciales fueron muy distintos (trazo verde; Fig. 15A). El perfil espacial de éste último se correspondió con el descrito previamente por DeFrance et al. (1973). Debido al menor umbral de la respuesta N₁₋₂, se utilizó éste como respuesta genuinamente monosináptica del LS a la entrada desde CA3.

Se cuantificaron la duración, latencia de inicio y amplitud de los fEPSPs en las distintas dianas. El instante de inicio de las respuestas fue tomado del comienzo del sumidero de corriente correspondiente en el CSD, ya que su mayor resolución espacial permitió una mejor discriminación que en el potencial provocado. Las latencias del inicio del fEPSP en las regiones CA1 ipsilateral (Schaffer), CA1 contralateral (comisural) y el LS ipsilateral (septal) fueron 2.8 ± 0.1 , 7.1 ± 0.2 y 7.5 ± 0.4 ms, respectivamente ($n=14$, 9 y 5 animales). En las tres regiones las respuestas obtenidas permanecieron tras estimulación repetitiva (5-10 Hz), criterio usado para inferir activación monosináptica. La duración de los fEPSPs en cada región fue cuantificada tal y como puede verse en las líneas discontinuas horizontales de la Figura 15B. Las correspondientes a los fEPSPs de Schaffer y Comisural fueron mayores que las de N_1 en el LS (Sch, 18.5 ± 0.6 ms [$n=14$]; Comm, 14.6 ± 0.7 ms [$n=9$]; N_1 , 10.8 ± 0.5 ms [$n=5$]; ANOVA de un factor). Las comparaciones por pares mostraron diferencias significativas entre todos ellos ($p < 0.001$, t de Student). La amplitud del fEPSP (línea discontinua vertical en la Figura 15B) se obtuvo en el punto de máxima negatividad, medido durante todo el periodo de la respuesta en CA1, y tras N_2 en el del LS. Utilizando intensidades de estímulo comparables, se obtuvieron fEPSPs de amplitud mucho mayor en CA1 que en el LS. Para intensidad subumbral, las amplitudes fueron 8.5 ± 0.4 , 4.7 ± 0.4 y 0.15 ± 0.04 mV (ratio de 57:31:1) en las respuestas de Schaffer, Comisural y LS, respectivamente.

No obstante, las duraciones y amplitudes relativas no reflejan fehacientemente las corrientes sinápticas asociadas. Por ejemplo, puede observarse en el caso particular de la respuesta en el LS, que el sumidero sináptico *sk1* solapa con corrientes asociadas a espigas y eventos di-sinápticos, estos últimos posiblemente debidos a inhibición di-sináptica (Fig. 15A). El hecho de que ambas corrientes aparecieran a intensidades tan bajas, hace pensar que el umbral de las interneuronas del LS con respecto a la entrada de CA3 es mucho menor que el de las células piramidales de CA1.

3.2.2. La actividad espontánea de CA3 produce LFPs de distinta amplitud en diferentes regiones diana.

Para estudiar la actividad espontánea, se estimó, en primer lugar, la potencia media y la distribución espacial del LFP nativo en CA1 y en el LS (la región CA3 como (auto) diana será estudiada posteriormente de manera separada). Evaluados sobre un episodio de tiempo de 10 min (media de $n=10$ animales), la potencia del LFP nativo registrado en el eje principal de las células piramidales de CA1 dependía fuertemente de la capa celular, siendo el valor en el *stratum oriens* de 0.047 ± 0.017 mV² (rango: 0.005-0.174 mV²) y en el *stratum lacunosum-moleculare* 0.22 ± 0.03 mV² (rango: 0.09-0.36 mV²; Fig. 16A). Por el contrario, en el LS la potencia fue menor y más homogénea a lo largo del eje con un valor medio de 0.010 ± 0.004

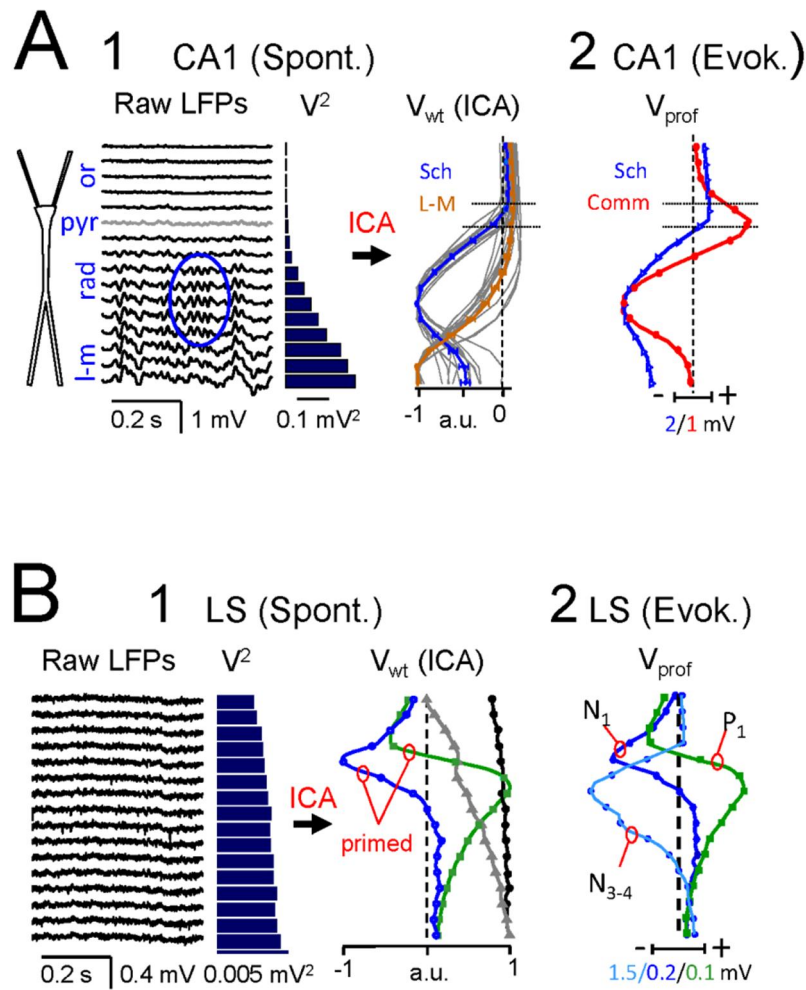


Figura 16. Características espaciales de la actividad provocada y espontánea por activación de CA3 en sus regiones diana. **A)** El perfil del LFP nativo (*raw*) de CA1 muestra un gradiente característico de aumento de potencia (V^2) hacia las dendritas apicales. (1) Al aplicar ICA al LFP se obtuvieron dos componentes (V_{wt}) parcialmente solapados (Sch y L-M). Los perfiles con trazo discontinuo pertenecen a animales distintos ($n=13$) y el trazo continuo se corresponde con la media y el error estándar en cada punto de registro del array. (2) Se muestran los perfiles de los potenciales provocados por estimulación subumbral de la región CA3 ipsi- (Sch, línea azul) y contralateral (Comm, línea roja). En ambos paneles las líneas horizontales delimitan la capa de somas. **B)** Los LFPs crudos en el LS tuvieron una potencia mucho menor. (1) Al aplicar ICA se obtuvieron dos componentes con perfiles lineales (trazos negro y gris) que contenían la mayor parte de la varianza. En fragmentos de LFP que contuvieron respuestas a estímulos eléctricos (*primed*) se obtuvieron, además, otros dos componentes de escasa entidad pero con perfiles espaciales similares a los de las respuestas N_1 y P_1 del potencial provocado (trazos azul y verde). (2) Con estímulos de mayor intensidad, apareció un componente adicional cuya distribución espacial fue similar al complejo N_{3-4} . Todos los componentes que contenían las respuestas provocadas contribuyeron con $<1\%$ a la varianza total. Excepto el panel A1, el resto de paneles solo muestran análisis de un experimento (ver Resultados para datos poblacionales). (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2015).

mV² ($n=4$ animales; rango: 0.007-0.014 mV²; Fig. 16B1). El ratio máximo CA1/LS obtenido para las potencias de ambas estructuras fue de 20:1.

Sin embargo, la existencia de múltiples aferencias locales y contribuciones lejanas por volumen (Sirota et al., 2008; Martín-Vázquez et al., 2013), hacen que el estudio de la actividad de una aferencia específica requiera su extracción de la mezcla de contribuciones que constituye el LFP. Para extraer dicha actividad se utilizó un método basado en ICA que permitió separar del LFP las distintas contribuciones específicas de vía sináptica. De esta forma, en CA1 se obtuvieron dos componentes significativos con perfiles de voltaje cuyos máximos (en valor absoluto) se encontraron en el *stratum radiatum* y en el *stratum lacunosum-moleculare*, respectivamente, y fueron estables y repetibles en todos los animales (Fig. 16A1). Previamente, dichos generadores habían sido descritos, el primero, como la entrada excitadora desde CA3 (Sch; Fernández-Ruiz et al., 2012a), y el segundo, como un componente mixto excitador/inhibidor (L-M; Benito et al., 2014). Se apreció un tercer componente correspondiente a la inhibición perisomática, pero cuya contribución al LFP era menor y hubiera requerido de análisis adicionales (aunque en este estudio no se muestra, se encuentra representado en la Figura 11B).

En ninguno de los animales analizados se consiguió separar las actividades de Schaffer y Comisural al aplicar ICA a registros de LFP. Por tanto, una posibilidad es que el componente de Schaffer, cuyo máximo de potencia se encuentra en el *stratum radiatum* (Fig. 16A), corresponda a una mezcla de las entradas ipsi- y contralateral desde sendas CA3, cuyos dominios sinápticos son similares. Sabemos que el perfil espacial de voltaje de la respuesta a la vía estimulada eléctricamente debe concordar con el de la actividad espontánea de la misma vía. Por tanto, para dilucidar si existe una contribución bilateral al generador de Schaffer se comparó su perfil espacial con el de los fEPSPs tras estimulación de la región CA3 ipsi- o contralateral. Se observó que el perfil obtenido con el estímulo ipsilateral era muy similar al del generador espontáneo de Schaffer, mientras que ambos diferían muy llamativamente del perfil del estímulo contralateral (Fig. 16A). Este resultado sugería que la contribución de la entrada ipsilateral de las células piramidales de CA3 es dominante en el LFP espontáneo de *stratum radiatum* con respecto a la entrada contralateral, mientras que la entrada contralateral espontánea no genera un componente independiente de varianza significativa.

En el LS, se observaron dos generadores de LFP dominantes, ambos con un perfil espacial de voltaje casi lineal, lo que indica que se corresponden con fuentes de origen lejano conducidas por volumen hasta los electrodos de registro en el LS (Fig. 16B). Ambos componentes suponían el 94-97% de la varianza total del LFP en esta estructura, por lo que la posible señal local tan sólo podría tener una contribución mínima. De hecho, se consiguieron identificar dos componentes locales del LFP adicionales, que suponían <1% de la varianza, en fragmentos que contenían abundante presencia de eventos estereotipados denominados Sharp Waves (SPWs) en

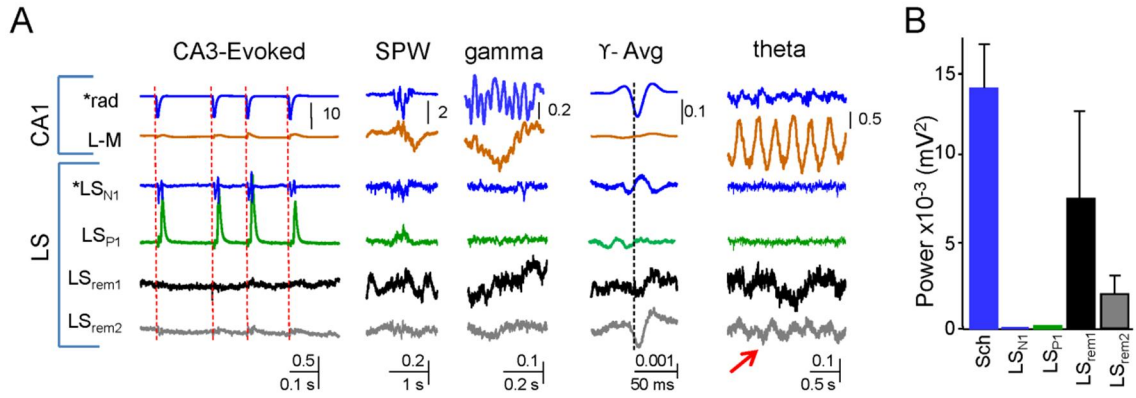


Figura 17. Patrones de actividad de los componentes del LFP en CA1 y LS. A) De izquierda a derecha: fragmentos de tiempo con eventos de LFP producidos por la actividad de CA3 (potencial provocado, Sharp Waves [SPWs], oscilación gamma [γ -Avg, $n=1600$ eventos]) y oscilaciones theta. Los asteriscos indican los componentes con origen monosináptico de CA3. **B)** Potencia media de los distintos componentes del LFP ($n=11$ animales para Schaffer y $n=4$ para los componentes del LS). (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2015).

la región CA1 con origen en la actividad de la región CA3; también se identificaron los mismos componentes minoritarios tras estimulación eléctrica de la propia región CA3, cuyas respuestas provocadas ejercen el papel de cebadores. De esta forma, se aumentó la varianza de estos componentes, permitiendo al ICA detectarlos como componentes independientes. Sus perfiles espaciales de voltaje se correspondieron con los de los componentes N_1 y P_1 del potencial provocado en el LS por el estímulo de CA3. Quedó patente, por tanto, la fuerte disparidad entre los LFPs generados por la entrada de CA3 en CA1 y en el LS. Debido a la inestabilidad y debilidad de este último, se hizo necesario el uso de modelos matemáticos para realizar un estudio comparativo.

Los componentes del LFP obtenidos mediante ICA preservan la evolución temporal de las señales originales (Stone et al, 2002; Makarova et al., 2011) y, por consiguiente, los eventos en el generador de Schaffer pueden ser usados como marca temporal para estudiar los eventos producidos por CA3 en otras regiones. Se pueden discriminar tres tipos de eventos en el LFP que se corresponden con otros tantos modos de actividad en la región de CA3, y que involucran distintos grados de sincronización aferente (Fig. 17A): i) fEPSPs provocados por estimulación, ii) SPWs y iii) oscilaciones en la frecuencia gamma que suponen una actividad basal (Fernández-Ruiz et al., 2012a,b; Benito et al., 2014). Los tres tipos de eventos tuvieron una mayor potencia en la región CA1. En el LS, los fEPSPs provocados y las SPWs espontáneas pudieron ser reconocidos ocasionalmente en el componente mono- (LS_{N1}) y di-sináptico (LS_{P1}), aunque con una amplitud mucho menor que en CA1. En cuanto a las oscilaciones gamma, no fueron evidentes en los generadores locales del LS, si bien se pudieron detectar mediante el

promediado de estos usando los eventos detectados en CA1 como marca temporal. Este promediado también resultó en potenciales visibles en el componente remoto LS_{rem2} . Además, éste presentó oscilaciones theta de pequeña amplitud que concordaban con las del hipocampo, que en trabajos previos ha sido adscrita al generador L-M. El hecho de que el componente LS_{rem2} presentase oscilaciones theta y gamma muy similares a las de CA1, hacen pensar que se trate de un generador remoto conducido por volumen desde el hipocampo. El generador remoto LS_{rem1} presentó una actividad irregular rápida intercalada con eventos similares a las oscilaciones lentas de la corteza, lo que sugiere un origen propagado desde esa región. El generador L-M exhibió una actividad irregular de gran amplitud en la que se intercalaban períodos de oscilaciones gamma, y fue el único generador de CA1 que presentó oscilaciones theta.

Se estimó la potencia media de los distintos componentes del LFP en el electrodo de máxima amplitud del LFP virtual reconstruido, siendo la contribución de CA3 al LFP de CA1 ipsilateral ~ 100 veces mayor que el LFP generado localmente en el LS por la misma entrada (Fig. 17B). Con respecto al LFP de la región CA1 ipsilateral, la potencia del componente L-M fue ~ 3 veces mayor, mientras que los componentes remotos del LS fueron $\sim 2-7$ veces menor, incluso siendo dominantes en el propio LS.

3.2.3. La morfología y distribución de las neuronas en diferentes regiones explica las escalas de amplitud del LFP

Los resultados anteriores indicaban que la entrada de CA3 produce LFPs de gran amplitud en la región de CA1 ipsilateral y casi imperceptibles en el LS. Debido a la ramificación axonal desde las células origen en CA3, se puede considerar que el patrón temporal de entradas excitadoras a las distintas regiones es común a todas ellas, por lo que otras variables, tales como la morfología, la topología de las aferencias o la organización espacial de dichas regiones, pueden estar jugando un papel fundamental como responsables de la discrepancia de amplitudes. La complejidad asociada al estudio experimental de dichos factores hace necesario el uso de modelos matemáticos de generación de LFP en agregados multicelulares (Makarova et al., 2011; Fernández-Ruiz et al., 2013). Para evaluar el impacto de estos factores se hizo uso del modelo de la región de CA1 desarrollado previamente (Martín-Vázquez et al., 2013), así como de un modelo del LS desarrollado para el presente estudio.

En los modelos se utilizaron neuronas tipo piramidal, que se dispusieron de forma organizada en empalizada para la región de CA1, y tipo interneurona, dispuestas de forma dispersa para el LS, manteniéndose en ambos casos la misma dirección del eje celular principal (Fig. 18A,B). Para simular una entrada común desde CA3, ambos agregados fueron excitados utilizando idénticas

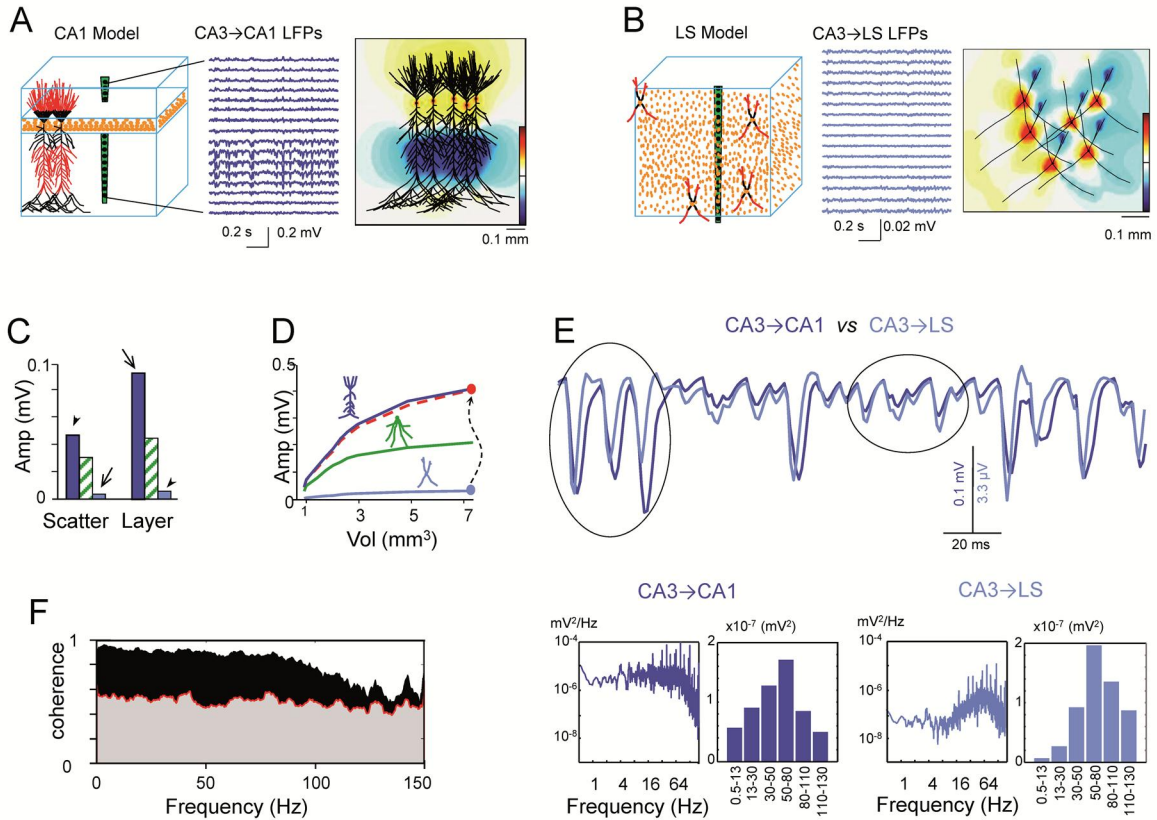


Figura 18. Las características cito-arquitectónicas y morfo-electrónicas de las neuronas de la región CA1 y el LS explican la diferencia en la amplitud de los LFPs. **A,B)** Paneles izquierdos: Modelos realistas de poblaciones neuronales de CA1 y LS. Las células piramidales de CA1 y las de tipo interneurona del LS se dispusieron ordenadas en una capa y de forma dispersa, respectivamente (los puntos naranjas indican la posición de los somas). Paneles intermedios: Se calculó el LFP en puntos que simulaban un multi-registro lineal, usando entradas excitadoras con un mismo patrón de oscilación gamma en las dendritas apicales y basales (zonas activas marcadas en rojo en los esquemas de la izquierda). Paneles derechos: Representación 2D instantánea de los contornos isopotenciales en un modelo con pequeños agregados. El agrupamiento espacial de las corrientes de entrada y salida en la población altamente ordenada de CA1 genera un dipolo macroscópico fuerte, mientras que la mezcla de corrientes en las neuronas dispersas del LS produce una cancelación que genera un LFP de menor amplitud. **C)** Amplitud media de los LFPs de los modelos de CA1 (barra azul) y LS (barra cian) utilizando citoarquitecturas realistas (flechas) e intercambiando las citoarquitecturas entre ambas estructuras (punta de flecha). Las barras verdiblancas corresponden a simulaciones realizadas utilizando una célula imaginaria con una morfología polarizada y superficie intermedia, similar a una célula granular. **D)** Muestra la amplitud media del LFP para agregados de tamaño creciente (utilizando el código de colores de D). El ratio de amplitud CA1/LS se mantuvo proporcional para los distintos tamaños de los agregados (línea roja discontinua; normalizado con respecto a los valores máximos de CA1). **E)** Detalle de los LFPs producidos en CA1 y LS por una misma entrada. Los eventos pequeños exhiben una dinámica similar mientras que los eventos mayores difieren en la duración y fase (óvalos). Los paneles inferiores (izquierda: espectro de potencia; derecha: potencia acumulada en distintos rangos de frecuencias) muestran el incremento del contenido de altas frecuencias en los LFPs debido al escalado macroscópico de la sumación intracelular de las distintas corrientes sinápticas en las células piramidales de CA1 o tipo interneurona del LS. **F)** Coherencia espectral entre los LFPs producidos en los modelos de CA1 y LS para una misma entrada oscilatoria (eventos variables con una frecuencia media de 45 Hz). La superficie negra representa la coherencia estadísticamente significativa. (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2015).

corrientes con patrón gamma oscilante, obtenidas experimentalmente. La amplitud media del LFP en CA1 fue 26 veces mayor que el del LS, en congruencia con los datos experimentales

(Fig. 18C). También se evaluó la dependencia que tiene la amplitud del LFP con respecto al tamaño del agregado celular (Fig. 18D). El rango de amplitud media en el LS fue de 3,5 a 30 μV para volúmenes de tejido de 1 a 7 mm^3 , que resultaron muy inferiores a la amplitud observada experimentalmente, y que era debida a fuentes remotas. El ratio de amplitud CA1/LS fue proporcional para agregados de tamaño equivalente y densidad celular similar.

Para evaluar por separado el efecto y contribución cuantitativa de la morfología celular y el de la distribución espacial de las neuronas, se realizaron simulaciones intercambiando citoarquitecturas, esto es, modelos de células piramidales de CA1 conformando agregados dispersos, y modelos de interneuronas del LS dispuestas en empalizada. Incluso así, las células piramidales dispersas produjeron un LFP 9,5 veces mayor que las interneuronas del LS alineadas (Fig. 18D). Además, se exploraron distintas configuraciones de morfología dendrítica en las interneuronas del LS, obteniéndose LFPs de mayor y menor amplitud para distribuciones completamente axiales y radiales, respectivamente, con un ratio máximo de potencia de 7,6. Hay que tener en cuenta que las células de ambas estructuras están formadas por neuronas con una cierta morfología axial que favorece la producción de LFP. Para evaluar otros aspectos de la morfología, se diseñó una célula imaginaria con morfología dendrítica polarizada y superficie dendrítica total intermedia. En los agregados celulares conformados por dicho modelo, el mismo patrón de entrada produjo un LFP de amplitud intermedia, enfatizando así el importante papel de la morfología celular. El corolario de estos resultados es que la gran diferencia en las amplitudes de los LFPs de la región de CA1 y el LS no se debe sólo a que las células del LS inyecten una menor cantidad de corriente en el espacio extracelular debido a su menor tamaño, sino también a la configuración espacial (3D) de la población neuronal. Así, la colocación de corrientes de una misma polaridad en las células piramidales de la región CA1 promueve la generación de LFPs de gran amplitud debido a la superposición de corrientes con la misma polaridad (Fig. 18A). En el caso de las interneuronas del LS, los dominios con corrientes de distintas polaridad se solapan, cancelándose entre ellos en el volumen y generando un LFP neto de amplitud mucho menor.

Sorprendentemente, aunque se utilizaron los mismos patrones temporales de activación oscilatoria gamma para excitar los distintos modelos celulares, los LFPs obtenidos en la región de CA1 y en el LS exhibieron diferencias temporales consistentes (Fig. 18E). Los eventos (o ciclos) individuales de las oscilaciones gamma en CA1 y el LS presentaron diferencias de duración y de fase en función de la magnitud de la entrada. Los eventos gamma de poca amplitud mostraron características similares en ambos modelos; no obstante, cuando los eventos gamma fueron de mayor amplitud exhibieron una duración menor en el LS y presentaron un desfase con respecto a los de CA1. Estas diferencias pueden deberse a las distintas dinámicas de

las corrientes en el interior de células de distinto tamaño y superficie (distinta constante de tiempo), que modulan la amplitud y curso temporal de las corrientes transmembrana. Estas diferencias en eventos particulares también se hicieron evidentes en las características espectrales macroscópicas del LFP. Así, las neuronas del LS produjeron LFPs con un mayor contenido relativo en altas frecuencias con respecto a las células de CA1 (Fig. 18E). Al estimar la coherencia espectral entre los LFPs de ambas estructuras se apreciaron diferencias dependiendo de la frecuencia, aunque dicho fenómeno era inestable y fuertemente dependiente de las características temporales de la entrada utilizada. Debido a la complejidad y alto número de parámetros anatómicos no se realizó ningún estudio paramétrico en este apartado. No obstante, en la Figura 18F se muestra, a modo de ejemplo, la coherencia entre las señales de ambas estructuras en un fragmento temporal en donde se aprecia una disminución en las altas frecuencias. Estos resultados sugieren que las características macroscópicas del LFP están moduladas por una distinta superposición espaciotemporal de las corrientes debidas a las características morfo-eletrotónicas de cada tipo de neurona.

3.2.4. La inactivación temporal de la región CA3 contralateral no revela la existencia de una contribución al LFP de CA1

Los axones de los colaterales de Schaffer y comisurales que provienen de los CA3 ipsi- y contralateral, respectivamente, tienen dominios sinápticos similares en CA1. No obstante, queda explicar si realmente la entrada contralateral no contribuye al LFP de CA1 y, si ese fuera el caso, cuál es el mecanismo. Para evaluar una posible contribución contralateral se extrajo el generador de Schaffer en ambos hipocampos antes y después de la inactivación temporal de la región CA3 en el lado izquierdo mediante la inyección localizada de lidocaína (Fig. 19A). Para optimizar la densidad de conexiones interhipocámpicas se realizaron los registros en zonas homotópicas (Finnerty y Jefferys, 1993). El efecto de la lidocaína fue monitorizado mediante estimulación eléctrica en las regiones CA3b de ambos hemisferios (Fig. 19B). Se observó una reducción selectiva de las respuestas provocadas por el estímulo de CA3 izquierda donde se inyectó la lidocaína, es decir, en las conexiones CA3_L-CA1_L y CA3_L-CA1_R. Las conexiones CA3_R-CA1_R no mostraron diferencias significativas tras la inyección, así como CA3_R-CA1_L, demostrando que la extensión espacial de la droga había sido restringida a un ámbito local y no alcanzó los axones comisurales que llegan a la región CA1 del hipocampo izquierdo desde la región CA3 derecha (Fig. 19B).

La inyección de lidocaína en la CA3 izquierda redujo instantáneamente la potencia del LFP de la región CA1 izquierda, mientras que permaneció intacto en la derecha (Fig. 19C). Incluso

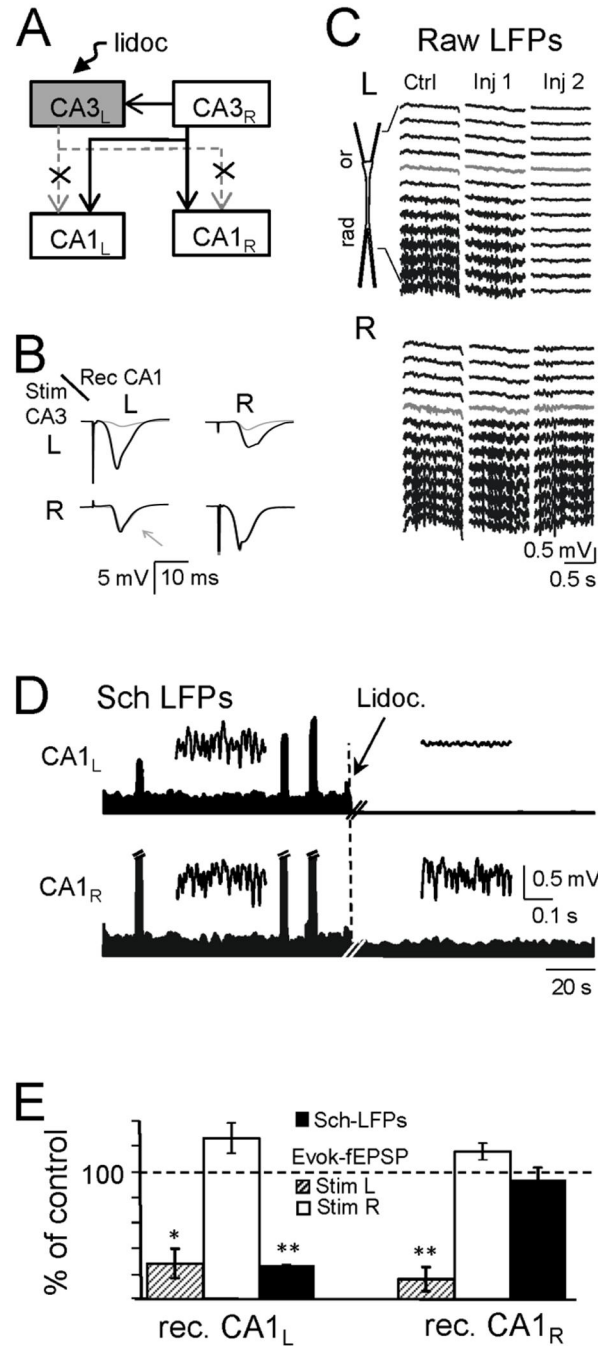


Figura 19. El bloqueo unilateral de la actividad de la región CA3 no afecta al LFP de CA1 del hipocampo contralateral. **A)** Esquema de la inyección y las vías afectadas (líneas discontinuas). **B)** Promedio de potenciales provocados (n=6 estímulos) registrados en el *stratum radiatum* de CA1 en los dos lados tras estimulación de ambas CA3, antes (trazo negro) y después (trazo gris) de la inyección de lidocaína en la CA3 derecha. Véase la reducción selectiva de los potenciales provocados por el estímulo de CA3 izquierda. **C)** Efecto de dos inyecciones de lidocaína (inj) en el LFP nativo de la región CA1 de ambos lados. **D)** Experimento representativo que muestra la evolución temporal de la potencia media de los generadores de Schaffer de ambos hipocampos. Los eventos de gran amplitud se corresponden con SPWs. Los fragmentos incluidos se corresponden con la actividad gamma basal. **E)** Muestra los datos poblacionales de la disminución de la amplitud de los distintos fEPSPs y de la potencia de los generadores de Schaffer de ambos hipocampos tras la inyección de lidocaína (expresado como el porcentaje con respecto al control). *p<0.01, **p<0.005, t de Student. (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2015).

inyecciones de mayor volumen (0.4-0.6 μ L), o múltiples que abolieron completamente el LFP en la región CA1 izquierda (posiblemente debido a la extensión de la droga a ésta), no afectaron al LFP de CA1 en el hipocampo derecho. Para evaluar específicamente el impacto que la inactivación tuvo sobre la actividad espontánea de CA3, se cuantificó el efecto sobre la potencia media de los generadores de Schaffer de ambos hemisferios (Fig. 19D). Sólo el componente ipsilateral correspondiente al generador Schaffer izquierdo se vio significativamente afectado (0.27 ± 0.02 mV² y 0.9 ± 0.1 mV²; $p < 0.01$, t de Student; datos recogidos en la Figura 19E; n=5 ratas). También se realizaron experimentos control en los que se inyectó salino siguiendo el mismo procedimiento, y no se obtuvieron cambios apreciables en ninguno de los LFPs (n=3 ratas).

Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que la mayor parte de la varianza del LFP correspondiente al generador de Schaffer, que es el componente predominante en el *stratum radiatum*, se corresponde con la entrada de CA3 ipsilateral, mientras que la entrada contralateral contribuye de manera inapreciable.

3.2.5. Importancia de la sincronización de la entrada sináptica: los eventos excitadores gamma espontáneos provocados por entrada desde CA3 sólo son visibles en la CA1 ipsilateral

Las entradas ipsi- y contralateral de sendas regiones CA3 convergen en las células piramidales de cada hemisferio. Aunque, como se ha visto, la actividad espontánea de la entrada contralateral no contribuye al LFP de CA1, esto no implica de manera alguna que las neuronas diana no sean activadas a nivel individual, es decir, que aunque la entrada no produzca LFP apreciable, las entradas sinápticas contralaterales despolarizan las células de manera significativa (recuérdense los factores macroscópicos que afectan a la conformación del LFP).

Afortunadamente, la evolución temporal de la entrada contralateral, invisible, pues, a nivel del LFP, puede ser obtenida del curso temporal de la señal ipsilateral en el otro hemisferio. Se estudió de forma detallada la forma de los eventos (o ciclos) individuales de las oscilaciones gamma que componen la actividad basal del generador de Schaffer, anteriormente interpretados como μ fEPSPs espontáneos (Fernández-Ruiz et al., 2012a). La obtención de los generadores de Schaffer en ambos hipocampos permitió evaluar la sincronización espontánea de eventos en los dos hemisferios (Fig. 20A). Se observó que la mayoría de los eventos coincidieron temporalmente en ambos hipocampos (denominados eventos pareados o bilaterales), aunque una pequeña proporción de ellos aparecieron sólo en un lado (eventos no pareados o unilaterales). Se encontraron un promedio de $5 \pm 1\%$ y $11 \pm 2\%$ de eventos unilaterales en el hipocampo izquierdo y derecho, respectivamente (n=5 animales), cuya amplitud era 32% (izquierdo) y 34% (derecho) menor respecto a los eventos bilaterales. En principio, la mayor

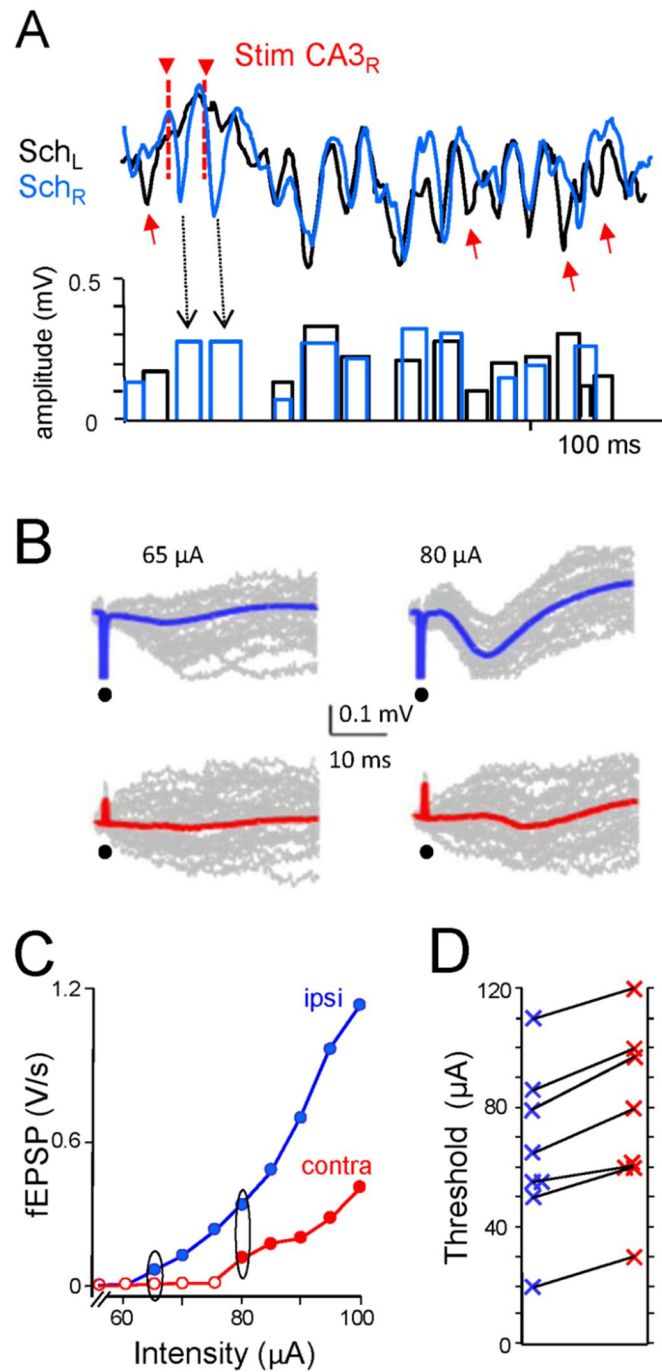


Figura 20. Los eventos espontáneos y provocados con estimulación mínima de la conexión CA3-CA1 sólo son visibles ipsilateralmente. **A)** Los eventos individuales de la oscilación gamma (trazos superiores) son identificados mediante el análisis de wavelet Haar (barras inferiores). La altitud y anchura de la barra se corresponde con la amplitud y duración de los eventos, respectivamente. La mayoría de los eventos estuvieron sincronizados (pareados) en ambos hipocampos, aunque algunos se presentaron de forma unilateral (flechas). La estimulación mínima en la CA3 derecha (triángulos) provocó fEPSPs de escasa amplitud (similar a los eventos gamma espontáneos) en la CA1 derecha, pero no en la izquierda. El panel ilustra un experimento representativo (ver la estadística poblacional en Resultados). **B)** Respuestas (promedio: trazo negro; respuestas individuales [n=30]: trazo gris) a estímulos de una de las regiones de CA3 registradas en ambos CA1. **C,D)** Curva entrada/salida de un experimento representativo y valores poblacionales (n=8 animales) correspondientes a los umbrales de aparición de los fEPSPs medibles en CA1 para estímulos ipsi- y contralateral (óvalos). Cada punto se corresponde con un promediado de 60 estímulos. (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2015).

amplitud de los eventos bilaterales puede deberse a una contribución residual de la CA3 contralateral, o a una menor entrada excitadora a las células piramidales de CA3 en ambos hemisferios, de tal manera que sólo en uno de ellos fue subumbral para activar el clúster de CA3 (y no generó el correspondiente μ fEPSP en CA1). Para estudiar las posibles causas, se compararon los eventos gamma espontáneos con fEPSPs provocados por una estimulación eléctrica mínima, con la intención de equiparar los bajos niveles de activación en ambas situaciones.

Al estimular la región CA3 con una intensidad mínima se obtuvieron fEPSPs con una amplitud y dinámica muy similar a los eventos gamma espontáneos, salvo por el hecho de que estos eventos provocados aparecieron únicamente en la región CA1 ipsilateral, como ocurrió con los eventos unilaterales espontáneos (Fig. 20A). Mediante una rampa de intensidades de estímulo se observó un rango en el cual los estímulos produjeron fEPSPs ipsilaterales con amplitud similar a los eventos espontáneos y en los que no se apreció un fEPSP contralateral (Fig. 20B). A partir de cierta intensidad éstos comenzaron a aparecer, manteniendo siempre menor amplitud que los ipsilaterales (Fig. 20C). El umbral de intensidad para generar un fEPSP contralateral fue de $10.8 \pm 1.6 \mu\text{A}$ mayor que para el ipsilateral ($n=8$; Fig. 20D). Estos datos indican que al activar un clúster artificial (por cercanía al electrodo) de neuronas de células piramidales en la región CA3 se provoca un LFP visible en la región CA1 ipsilateral pero no en la región de CA1 contralateral homotópica. Sólo cuando el clúster artificial es suficientemente grande (al aumentar la intensidad de estímulo) se observa una señal en la región de CA1 contralateral. Esto sugiere que para los bajos niveles de activación que ocurren durante actividad espontánea en la vía Schaffer (oscilaciones gamma) la contribución contralateral no alcanzaría un valor medible en el LFP.

3.2.6. La dominancia de las dendritas apicales de CA1 en la producción de LFPs favorece la entrada ipsilateral y ocluye la contralateral

Resulta sorprendente que tanto los eventos espontáneos como los provocados por estimulación eléctrica en CA3 produzcan potenciales negativos en las dendritas apicales pero no en las basales, a pesar de que los axones de CA3 ramifican y tienen dominios sinápticos en ambas zonas. Para explorar esta discrepancia anatomo-funcional se utilizaron modelos matemáticos con una configuración realista y detallada de las sinapsis apicales y basales (Shinohara et al., 2012). Para simular las entradas ipsi- y contralateral de las regiones CA3, se usaron corrientes en forma de oscilaciones excitadoras a una frecuencia media de 45 Hz sobre los territorios sinápticos ipsi y contralateral (Fig. 20A). La magnitud relativa y extensión espacial de los dominios sinápticos de ambas aferencias sinápticas fue establecida de tal manera que el ratio de excitación apical/basal fue de 4,5:1 y 1:2 para las entradas ipsi- y contralateral, respectivamente (Fig. 21A).

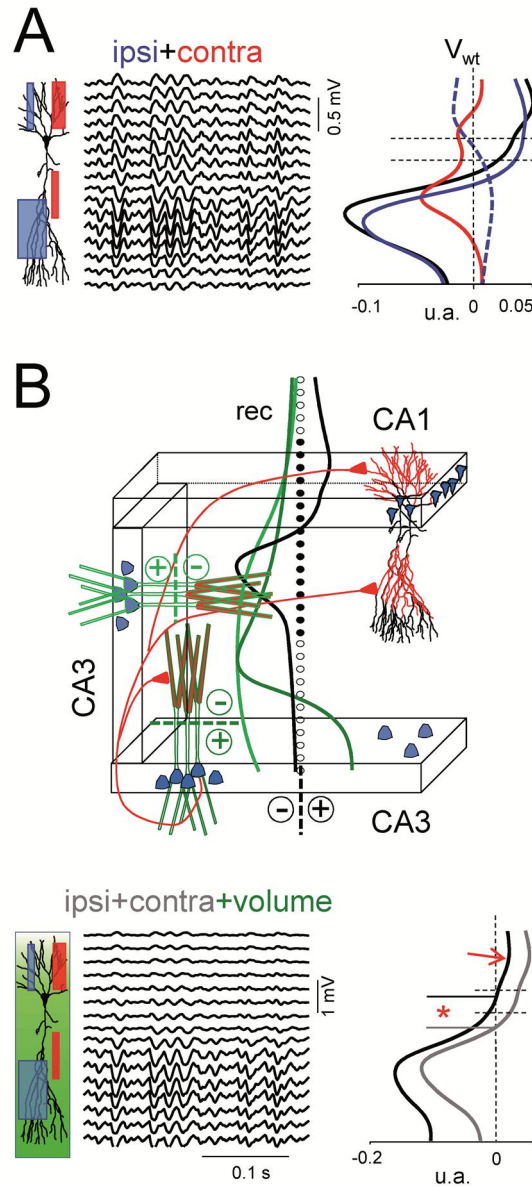


Figura 21. La dominancia de las dendritas apicales y la conducción por volumen desde regiones cercanas influyen en el perfil del LFP de CA1. **A)** La posición y anchura de los recuadros indican los territorios sinápticos y fuerzas relativas de las entradas ipsi- (azul) y contralateral (rojo) a CA1. Las curvas espaciales del panel derecho fueron obtenidas al aplicar ICA al LFP con entradas separadas (azules y rojas) y combinadas (curva negra). En todas las simulaciones fueron activadas las dendritas basales y apicales, salvo en el caso de la curva azul discontinua que resultó de la activación ipsilateral selectiva de las dendritas basales. **B)** La influencia de las corrientes conducidas por volumen de los eventos gamma en la propia región CA3 (recurrentes) modifica las características de los eventos gamma en CA1, que ocurren de forma simultánea. Se añadieron dos bloques de neuronas (simulando la región CA3) al modelo de CA1. La excitación recurrente de CA3 fue simulada por activación de las dendritas apicales en CA3, y el LFP producido fue calculado en un tracto lineal de CA1 simulando un electrodo de registro (círculos). El perfil del LFP generado por ambos bloques de CA3 fue representado mediante curvas (trazos verdes) y consistió en un perfil netamente negativo. La curva negra representa el perfil de la entrada combinada ipsi- y contralateral de CA3 a CA1. En los paneles inferiores se muestra el efecto combinado de la actividad local y la actividad conducida por volumen. Derecha: La curva negra muestra el perfil conjunto, mientras que la curva gris representa la actividad local sin el efecto del volumen añadido. Los cambios más notables fueron el desplazamiento del punto de reversión del potencial (asterisco), la disminución de la positividad somato-basal (flecha) y un aumento neto de los potenciales negativos de las dendritas apicales.

La entrada ipsilateral produjo LFPs con un perfil espacial bipolar, exhibiendo una gran negatividad en el *stratum radiatum* y un potencial positivo que comienza a ser apreciable debajo de la capa piramidal y se extiende hasta las dendritas basales (Fig. 21A, trazo azul continuo). Esta positividad en el *stratum oriens* ocurre a pesar de que la activación abarca también a las sinapsis excitadoras de esa región (la simulación aislada de éstas produjo un potencial negativo menor en el *stratum oriens*; Fig. 21A, trazo azul discontinuo). Por el contrario, la entrada contralateral generó LFPs con un perfil espacial de potencial negativo en todo el eje de la célula, y con dos mínimos: en las dendritas basales y apicales (Fig. 21A, trazo rojo). Para comprobar la estabilidad de dicho perfil se testaron distintas configuraciones de la aferencia contralateral. No se observaron diferencias cualitativas al variar la potencia de la corriente de entrada ni al utilizar distintos ratios de densidades sinápticas apical/basal. Tampoco se observaron cambios apreciables al modificar la distribución espacial de las dendritas basales desde una configuración en forma de abanico a una disposición vertical en paralelo. Por tanto, a pesar de que las dendritas apicales recibían la mitad de la densidad de corrientes excitadoras que las dendritas basales, produjeron un LFP de mayor magnitud. La predominancia de la contribución de las dendritas apicales al LFP puede deberse a su configuración global axial y a la mayor proporción de corrientes excitadoras ipsilaterales que contralaterales en el tronco apical.

Al hacer una simulación con las entradas ipsi- y contralateral activadas simultáneamente se produjo un LFP muy similar al obtenido por la entrada ipsilateral sólo (Fig. 21A, trazo negro). Esto concuerda con los resultados obtenidos previamente relativos a la mayor contribución de la aferencia sináptica proveniente de la región CA3 ipsilateral. No obstante, llama la atención que los potenciales provocados contralaterales obtenidos experimentalmente no producen fEPSPs con un perfil espacial negativo similar al obtenido en el modelo. Tampoco se explica la gran positividad observada en la capa piramidal y *stratum oriens* en la simulación de la entrada ipsilateral, que es casi inapreciable en los eventos espontáneos observados experimentalmente. Ambas cuestiones serán estudiadas en los siguientes apartados.

Es importante tener en cuenta que la fuerte sincronía y el alto grado de solapamiento espacial entre las entradas ipsi- y contralateral constituyen un marco poco idóneo para el funcionamiento óptimo de los algoritmos de ICA (Makarova et al., 2011). Por esa razón, se realizaron simulaciones de generación de LFP en las que se usaron distintas densidades relativas de conductancia sináptica (ratio basal/apical de 0.5/1 a 2/1) y distintos retrasos temporales (desde 0 a 10 ms) entre ambas entradas. Una vez obtenidos los LFPs utilizando varianzas totales realistas para las señales ipsi- y contralateral, de 4% y 1%, respectivamente, aplicamos ICA sobre ellos para estudiar la eficiencia de la separación de las dos entradas. Por comparación con las señales de entrada, se observó que la separación y la fiabilidad temporal de los componentes obtenidos

dependen tanto de las varianzas absoluta y relativa de cada entrada sináptica como de su discrepancia temporal. Para retrasos promedio de las oscilaciones excitadoras entre las dos entradas menores de 2 ms, no fue posible la separación. Para retrasos mayores, la entrada ipsilateral se obtuvo con una fiabilidad casi óptima debido a la dominancia de las dendritas apicales en la producción de LFP, mientras que la contralateral se obtuvo de forma subóptima o quedó completamente ocluida o adscrita a componentes ruidosos.

Todos estos resultados sugieren que aunque la alta sincronía de la entrada contralateral hubiese pasado desapercibida para el umbral de detección del ICA, la dominancia de las corrientes en las dendritas apicales en la producción de LFP favorece la oclusión de dicha entrada. Por tanto, el componente del LFP experimental obtenido con ICA, que presenta su máximo de potencia en el *stratum radiatum* (denominado generador Schaffer) puede ser considerado, sin apreciable riesgo de contaminación, como la aferencia sináptica de las células piramidales de la región CA3 ipsilateral.

3.2.7. La simultaneidad de corrientes oscilatorias gamma en regiones cercanas modifica el perfil local del LFP de CA1

En los apartados anteriores se utilizaron exclusivamente modelos de agregados celulares de CA1 para simular el LFP producido por las entradas ipsi- y contralateral desde las regiones de CA3 izquierda y derecha. Sin embargo, la cercanía espacial de las corrientes generadas en la propia CA3 por excitación recurrente y su presumible sincronía temporal, pues provienen de ramificaciones de un mismo axón, planteaba la posibilidad de que existiese una contribución importante de conducción por volumen que estuviese afectando a la señal generada de forma local en CA1.

Para verificar esta hipótesis, se diseñó una estructura de CA3 simplificada que consistía en dos bloques perpendiculares contiguos al bloque de CA1 utilizado en los apartados anteriores (Fig. 21B; ver Materiales y Métodos). La entrada recurrente de las células piramidales de CA3 fue simulada como una excitación en las dendritas apicales con el mismo patrón temporal que el de la entrada de Schaffer a CA1. Los dipolos de CA3 generaron un perfil de voltaje netamente negativo en CA1. Al simular simultáneamente las entradas ipsi- y contralateral con la actividad recurrente de CA3, se obtuvo un perfil cualitativamente distinto en CA1 (Fig. 21B; panel inferior). El punto de reversión de la polaridad de CA1 se desplazó hacia la capa de somas, quedando la positividad en la zona de las dendritas basales muy reducida, de forma que el perfil presentó una dominancia negativa similar al obtenido experimentalmente. Además, la amplitud neta de la negatividad del *stratum radiatum* fue mayor.

Estos resultados muestran que oscilaciones en regiones cercanas que se presentan de forma sincrónica pueden afectar a propiedades esenciales tales como el punto de reversión de la polaridad del potencial o el ratio de negatividad/positividad, utilizadas frecuentemente en la caracterización de señales oscilatorias.

3.2.8. La coactivación de inhibiciones somáticas contribuye a las diferencias existentes entre potenciales espontáneos y provocados ipsi- y contralaterales

Los axones de las células piramidales de CA3 proyectan tanto a las células piramidales de CA1 como a interneuronas de la propia CA1, las cuales actúan sobre las células piramidales de CA1 inhibiendo su actividad (Andersen et al., 1963; Buzsaki y Eidelberg, 1982b; Buzsaki, 1984; Zemankovics et al., 2013). La existencia de dicha conectividad puede hacer que durante la estimulación eléctrica exista, en los potenciales provocados ipsi- y contralateral, una confluencia espacio-temporal de corrientes inhibitoras (disinápticas) con las corrientes excitadoras propias de las vías estimuladas. Esta posible mezcla de corrientes podría afectar de manera cualitativa a los perfiles espaciales de los potenciales provocados afectando a nivel unitario la distribución de corrientes esperada con respecto a la de una excitación aislada. Para verificarlo se obtuvieron fEPSPs ipsi- y contralaterales estimulando eléctricamente la región CA3 de uno de los hemisferios a una intensidad umbral para el fEPSP contralateral. Como era de esperar, los potenciales ipsilaterales presentaron una variabilidad muy baja (Fig. 22A). Sin embargo, los potenciales contralaterales fueron muy variables en el *stratum radiatum*, incluso no apareciendo en algunos casos, mientras que en la capa piramidal presentaron una positividad abrupta de potencia similar al potencial del *stratum radiatum* (Fig. 22A). Estos potenciales positivos somáticos presentaron un retraso temporal de ~2 ms con respecto al potencial de las dendritas apicales, y en algunos casos incluso se observó disociación completa en ambos estratos (la misma observación se realizó en 8 animales). Esto pone de manifiesto que las respuestas contralaterales en dendritas apicales y en la capa de somas obtenidas con intensidades de estímulo cercanas al umbral no pertenecen al mismo dipolo e involucran a distintos mecanismos celulares.

Para estudiar dicho fenómeno, se obtuvieron los perfiles espaciales de los potenciales provocados ipsi- y contralateral con intensidades de estímulo crecientes (Fig. 22B). Al normalizar los perfiles observamos que el correspondiente al estímulo ipsilateral fue homogéneo, mientras que el contralateral presentó diferencias entre las capas de somas/dendritas basales y dendritas apicales. Se obtuvieron resultados similares en los 5 animales analizados, aunque el ratio de negatividad/positividad en el perfil del potencial fue muy variable (desde 1/1 a 5/1). Esta disociación somato-basal de los potenciales contrasta con lo esperable para una excitación común basal y apical, pues deberían aumentar

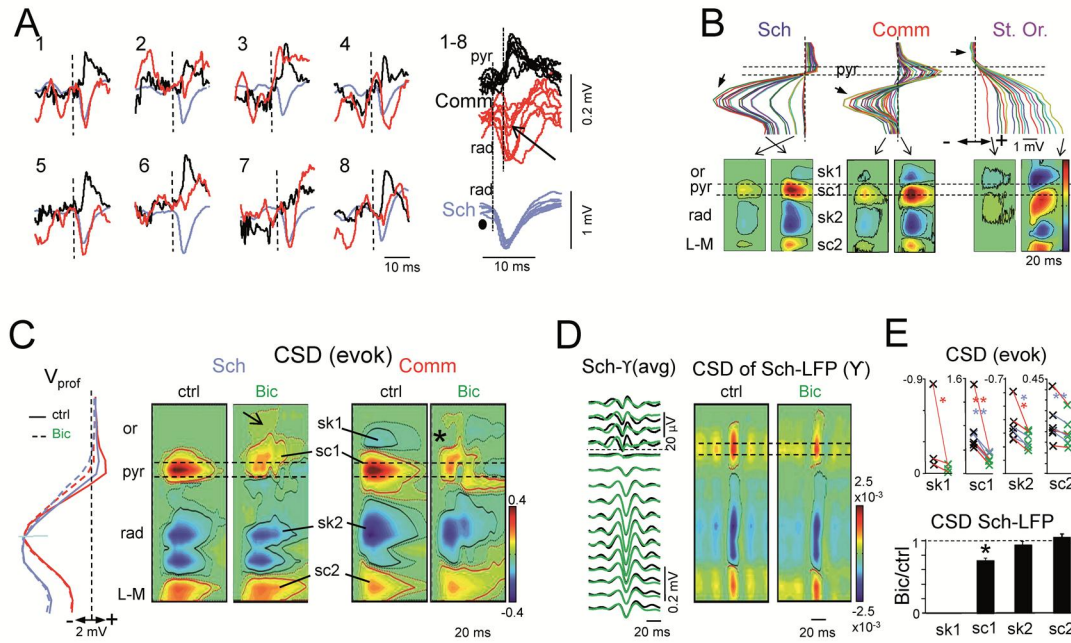


Figura 22. La entrada ipsi- y contralateral de CA3 activa diferencialmente inhibiciones somáticas en CA1 que interactúan con las corrientes excitadoras. **A)** Se muestran ocho respuestas consecutivas a la estimulación de CA3 con intensidades cercanas al umbral de la entrada contralateral (Comm) registradas en CA1 (línea discontinua: instante del estímulo; los trazos negros y rojos corresponden a registros en la capa piramidal y dendritas apicales, respectivamente). Los fEPSPs ipsilaterales (Sch) están representados en azul. **B)** Los paneles superiores muestran los fEPSPs de estímulos con intensidades crecientes en las vías de Schaffer y Comisural, y en el *stratum oriens* de CA3a. Las flechas indican el punto de máxima negatividad de cada fEPSP. Los paneles inferiores muestran los contornos de los CSDs a dos intensidades. Calibración del CSD: Sch ± 1.1 , Comm y St. Or. 0.4 (unidades arbitrarias). **C)** Izquierda: perfiles de voltaje del fEPSP para estímulos ipsi- (azul) y contralateral (rojo) antes (líneas continuas) y después (líneas discontinuas) de la inyección de bicuculina en el *stratum pyramidale/oriens*. Derecha: contornos de corriente antes y después de la inyección (flecha: disminución de la fuente activa y extensión de la fuente pasiva; asterisco: desaparición del sumidero de *stratum oriens* junto con la fuente activa somática). **D)** Izquierda: Promedio de perfiles espontáneos de eventos de gamma (generador de Schaffer) antes (trazo negro) y después (trazo verde) de la inyección de bicuculina. Derecha: Contornos de corriente correspondientes. **E)** Panel superior: efecto de la bicuculina en las fuentes y sumideros de Sch (línea azul) y Comm (línea roja). Panel inferior: mismos resultados para los eventos gamma espontáneos. * $p < 0.01$, $p < 0.005$, t de Student; $n = 3$. (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2015).

proporcionalmente al incrementar la intensidad del estímulo, como en el caso del estímulo ipsilateral.

Los resultados anteriores apoyan la existencia de varios mecanismos (con diferentes dinámicas) involucrados en la generación de potencial en la región de dendritas basales/capa de somas y dendritas apicales. Las evidencias sugieren la intervención de inhibiciones somáticas. Para verificar la hipótesis inhibitoria se inyectaron microgotas de bloqueantes de receptores GABA_A Bicuculina (1 mM) y Gabazina (0.15 mM; datos no mostrados pero cualitativamente similares a

los de bicuculina) localmente a través de una pipeta en la zona superior de la capa piramidal. Los perfiles de voltaje de los potenciales provocados ipsi- y contralateral antes y después de la inyección mostraron que los bloqueantes de receptores GABA_A habían reducido la positividad somática sin afectar el potencial en otras regiones (Fig. 22C; panel izquierdo). Las reducciones más importantes de las corrientes obtenidas por CSD se produjeron en las fuentes somáticas (donde existe una fuerte contribución de corrientes activas inhibitoras proveniente de las células en cesto) y en menor grado en los sumideros apicales (Fig. 22C; panel derecho). En valor promedio, las fuentes somáticas se redujeron en un 55% y 66% para las respuestas ipsi- y contralateral ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente; t de Student; $n = 4$; Fig. 22E). Sorprendentemente, también se observó una reducción del sumidero basal casi completa, que sólo se producía tras el estímulo contralateral. Esto indicaría que el sumidero basal está contribuido principalmente por sumideros pasivos de retorno producidos por la inhibición somática concurrente, en lugar de estar causado por una excitación basal. Además, la fuente somática remanente se desplazaba y extendía hacia las dendritas basales, lo que implicaría que las corrientes de retorno producidas por el sumidero apical alcanzarían ahora regiones más lejanas de la célula al disminuir el efecto cortocircuito producido habitualmente por la inhibición somática.

En el análisis de la actividad espontánea se obtuvieron resultados similares. Así, se detectaron eventos gamma individuales en el generador de LFP de Schaffer (ver Materiales y Métodos) y se utilizaron los momentos de inicio para promediar los perfiles del LFP y CSD nativos. En el correspondiente al LFP, se observaron diferencias en la región somato-basal antes y después de la inyección de Bicuculina, mientras que el resto del perfil fue similar (Fig. 22D). Utilizando la mayor resolución espacial del CSD se aislaron las fuentes y sumideros en las distintas bandas y se cuantificó su amplitud, observándose una reducción significativa del 28% en la fuente somática ($p < 0.05$; t de Student; $n = 3$; Fig. 22E, panel inferior).

Estas observaciones indican que los estímulos ipsi- y contralateral producen una coactivación diferencial de la inhibición somática, lo que contribuye a las diferencias existentes en sus perfiles espaciales. La eliminación exógena de la inhibición concurrente produjo una equiparación de los perfiles espaciales correspondientes a actividad provocada y espontánea, explicando las divergencias entre éstas descritas anteriormente.

3.2.9. La excitación recurrente CA3-CA3 produce LFP

La aplicación del ICA a un registro de LFPs a lo largo del eje transversal del hipocampo que comprende las regiones CA1 y CA3, proporciona el generador de Schaffer con dos máximos, uno en CA1 (estudiado anteriormente y que corresponde a la entrada desde CA3 a través de los

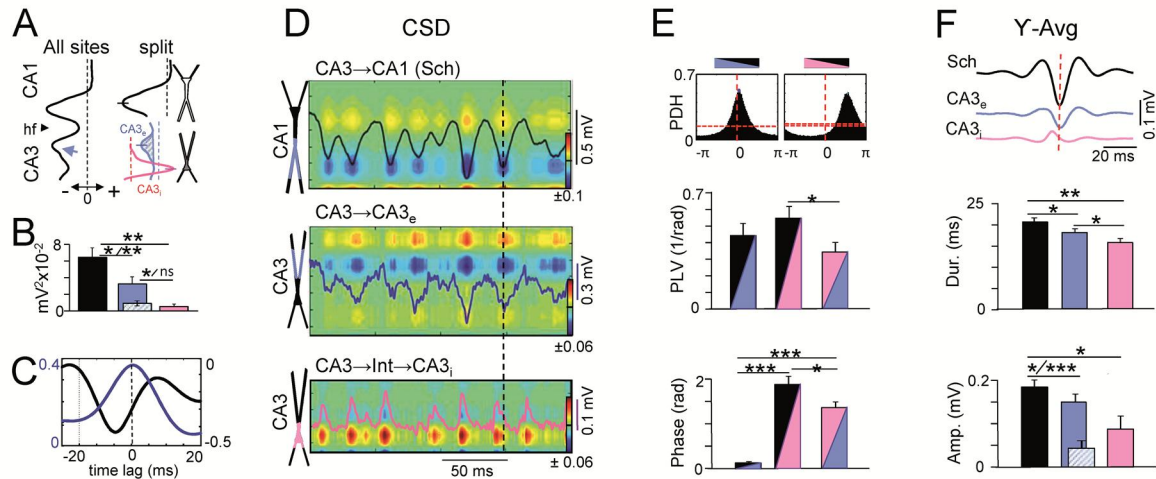


Figura 23. Contribuciones de la excitación e inhibición recurrente al LFP de CA3. **A)** Izquierda: Perfil espacial de voltaje del componente de Schaffer obtenido al aplicar ICA a un registro de LFP que abarcó CA1 y CA3. Flecha: máximo local en CA3. Derecha: Análisis separado de los registros de CA1 (generador de Sch, curva negra) y CA3 (generadores recurrentes excitador [CA3_e, curva azul] e inhibitor [CA3_i, curva rosa]). Datos de un experimento representativo. **B)** Cuantificación de la potencia media de los distintos generadores. El componente excitador (azul) fue corregido para eliminar una posible conducción por volumen (azul rayado). **C)** Correlación cruzada entre los generadores de Schaffer y CA3_e (azul), y Schaffer y CA3_i (negro). Cuantificación en Resultados. **D)** CSD de un fragmento con oscilaciones gamma. En cada panel se muestra, superpuesta, la evolución temporal del LFP de cada generador en el punto de máxima potencia. **E)** Panel superior: histograma de densidad de probabilidades entre los cursos temporales de Schaffer (negro), CA3_e (azul) y CA3_i (rosa). El cruce de colores indica los pares de generadores cruzados. Panel medio e inferior: cuantificación del PLV y la fase media, respectivamente. **F)** Panel superior: Promedio de los cursos temporales de los tres generadores con respecto a los instantes de los eventos gamma detectados en el generador de Schaffer. Panel medio e inferior: cuantificación de la duración y amplitud media de los eventos individuales. (Fragmentos de 15 minutos). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. t de Student; $n = 4$ en (B,E,F). (Tomado de Martín-Vázquez et al., 2015).

colaterales de Schaffer) y otro menor en el *stratum radiatum* de la propia región CA3 (Fig. 23A; panel izquierdo). El hecho de que ambas deflexiones queden adscritas al mismo generador de LFP indica que las señales del LFP producidas en CA1 y CA3 por la actividad de las células piramidales de CA3 están muy sincronizadas (Makarova et al., 2011). Sin embargo, la compleja topología de los distintos clústeres celulares de CA3 podría hacer que las aferencias de Schaffer a CA1 y las recurrentes a CA3 proviniesen de clústeres distintos en distintos instantes, por lo que los LFPs de cada región podrían diferir y no ser perfectamente sincrónicos. Para comprobarlo, se aplicó ICA al LFP de las dos regiones por separado. Este fraccionamiento de los registros para el análisis no plantea ningún problema teórico pues ambas regiones contienen elementos celulares generadores de LFP distintos y están bien delimitadas, sin solapamiento espacial entre ellos, a saber, las células piramidales de CA1 y de CA3 (Fig. 23A; panel derecho). De esta forma, se incrementó la varianza relativa de las fuentes locales en cada región y, en consecuencia, la precisión temporal. Los generadores de LFP obtenidos con el LFP dividido tuvieron un perfil similar al obtenido anteriormente en su conjunto: el componente de

CA1 se corresponde con el de Schaffer y el de CA3 con la deflexión del *stratum radiatum* de CA3, que denominamos como CA3_e. En los siguientes análisis se tuvo en consideración un generador adicional descrito previamente (Benito et al., 2014), denominado CA3_i, cuyo máximo de potencial está localizado en el *stratum pyramidale* de CA3 y se corresponde con una inhibición somática en esta región.

La potencia media del LFP reconstruido en el electrodo de máxima potencia del generador CA3_e fue de $0.033 \pm 0.008 \text{ mV}^2$ y en el caso de CA3_i fue de $0.006 \pm 0.003 \text{ mV}^2$ (Fig. 23B). Sin embargo, la deflexión del perfil de CA3_e se encontró sobre una envolvente, debido posiblemente a una conducción por volumen desde otras regiones del hipocampo, por lo que se evaluó la potencia media corrigiendo dicho *offset*, y obteniéndose valores de $0.009 \pm 0.003 \text{ mV}^2$, que eran ~9 veces menor que los correspondientes al generador de Schaffer (Makarov et al., 2010). La correlación cruzada entre las evoluciones temporales de los tres generadores reflejó diferencias significativas: 0.4 ± 0.06 entre Schaffer y CA3_e y -0.46 ± 0.08 entre Schaffer y CA3_i (Fig. 23C; fragmentos de 730-1000 segundos; n=4 animales). En un periodo representativo de intensa actividad gamma, se obtuvieron los perfiles de CSD de los tres generadores: CA3_e mostró un par fuente/sumidero dendrítico que estaba perfectamente alineado con sumideros de Schaffer en CA1, mientras que CA3_i presentó fuentes somáticas que preceden al sumidero de Schaffer en CA1 (Fig. 23D). Para estudiar la relación de fase de las oscilaciones gamma de los tres generadores se construyeron histogramas de densidad de probabilidad para las señales filtradas en la banda de frecuencias 30-60 Hz (Fig. 23E). Los histogramas de Sch-CA3_e y Sch-CA3_i mostraron que las fases estaban acopladas, exhibiendo distinta fase preferente. El acoplamiento fue significativo en todos los casos (n=4 animales), siendo ligeramente mayor para el par Sch-CA3_i (Fig. 23E; histograma medio). La diferencia de fase de Sch-CA3_e fue de $6.7 \pm 1.7^\circ$ mientras que Sch-CA3_i mostró valores de $110 \pm 10^\circ$ (Fig. 23E; histograma inferior). Hay que tener presente que, como el generador CA3_i no es monosináptico como los de Schaffer y CA3_e, la alta relación de fase se debe, probablemente, al propio mecanismo de generación del ritmo gamma en la región de CA3.

Al promediar los tres generadores de LFP con respecto a los instantes de los eventos individuales de Schaffer de CA1 (ver Materiales y Métodos) se observaron diferencias notables en las propiedades de las oscilaciones gamma en cada uno de los generadores (Fig. 23F; panel superior). Las duraciones medias de los tres componentes presentaron diferencias significativas, siendo los eventos de Schaffer ($18.2 \pm 0.7 \text{ ms}$) los de mayor duración seguido de CA3_e ($20.7 \pm 0.7 \text{ ms}$) y posteriormente de CA3_i ($15.8 \pm 0.9 \text{ ms}$; Fig. 23F, panel medio). Las amplitudes también mostraron diferencias significativas, con proporciones similares a las obtenidas en la cuantificación de las potencias medias (Fig. 23F, panel inferior).

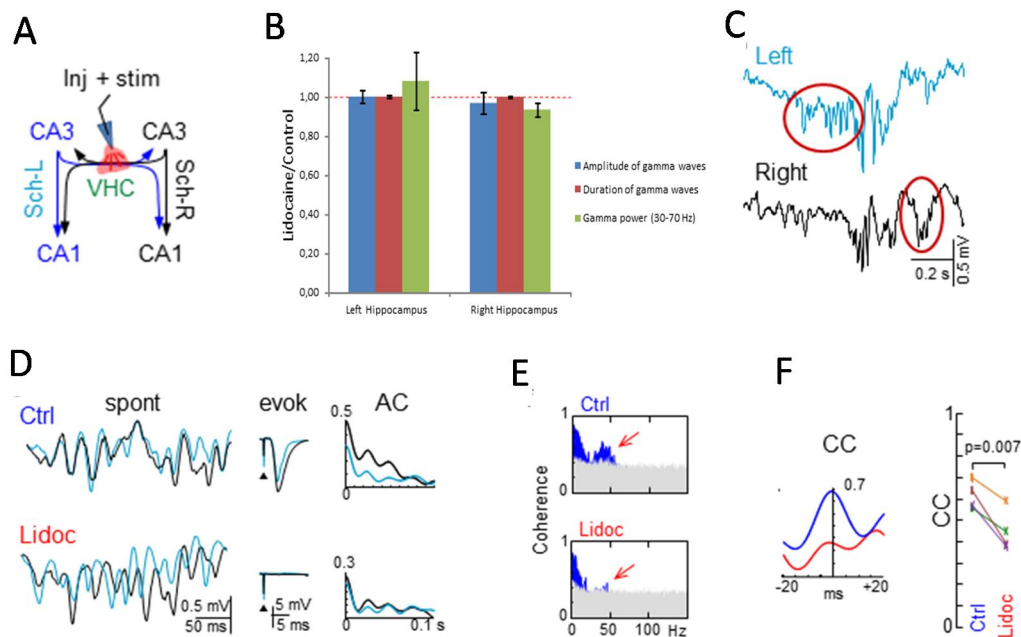


Figura 24. El bloqueo de la comisura ventral hipocámpal desacopla los osciladores gamma de la región de CA3 de ambos hemisferios. **A)** Esquema experimental: la lidocaína fue inyectada localmente en la comisura ventral hipocámpica a través de una pipeta que permitió la estimulación eléctrica mediante la que se monitorizó el efecto del fármaco. **B)** Efecto de la lidocaína en la amplitud (azul) y duración (rojo) de los eventos individuales de la oscilación gamma así como en la potencia gamma (30-70 Hz; verde) de los generadores de Schaffer de ambos hemisferios. Los valores se representan normalizados con respecto al control. No hubo diferencias significativas ($n=4$; fragmentos de 50-100 segundos; t de Student). **C)** Se muestran cadenas de eventos gamma unilaterales (óvalos rojos) que aparecieron únicamente tras la inyección de lidocaína. **D)** Panel izquierdo: La inyección de lidocaína también afecta a la sincronización de los eventos gamma individuales entre el hemisferio izquierdo (trazo celeste) y derecho (trazo negro). Panel medio: El potencial provocado en las regiones de CA1 de ambos hemisferios desaparece completamente tras la inyección. Panel derecho: El autocorrelograma (AC) de la actividad de Schaffer en ambos hemisferios antes y después de la inyección mostró la existencia de oscilaciones gamma similares en todos los casos. **E)** La coherencia espectral antes y después de la inyección entre ambos hemisferios muestra la desaparición de la coherencia significativa (región azul) específicamente en la banda gamma (~40 Hz; flecha roja). **F)** Panel izquierdo: Reducción de la correlación cruzada entre ambos hemisferios tras la inyección de lidocaína en un experimento representativo. Panel derecho: Disminución de la correlación cruzada en los cuatro animales analizados (t de Student).

3.2.10. La dinámica de la entrada ipsilateral CA3-CA1 revela la existencia de un acoplamiento funcional entre los circuitos de CA3 de ambos hemisferios

El conjunto de los resultados previos demostró que el componente del LFP obtenido con ICA cuyo máximo de amplitud neta se encuentra en el *stratum radiatum* (generador Schaffer) estaba formado por las corrientes producidas por la entrada ipsilateral de las células piramidales de CA3 a las células piramidales de CA1 a través de los colaterales de Schaffer. Por tanto, el estudio de las oscilaciones gamma del *stratum radiatum* de CA1 obtenidas mediante ICA ofrece una lectura de la actividad del circuito ipsilateral. El hecho de que la gran mayoría de eventos de los generadores de Schaffer de ambos hemisferios ocurriesen de forma simultánea, hacía pensar

que los circuitos de CA3 estaban recibiendo una entrada común o bien estaban fuertemente interconectados.

Aunque las regiones CA3 de ambos hemisferios reciben aferencias comunes (Vandecasteele et al., 2014), la existencia de una fuerte red de interconexiones entre los hipocampos de ambos hemisferios a través de la comisura ventral hipocámpica (Blackstad, 1956; Laurberg et al., 1979; Fernandez de Lima et al., 1990) sugiere que quizás esta última esté jugando un papel importante en el acoplamiento de la actividad bilateral. Para comprobar dicha hipótesis se inyectaron microgotas de lidocaína localmente en la comisura ventral hipocámpica a través de la propia pipeta de estímulo (Fig. 24A). La efectividad de la inyección fue comprobada observando la reducción de los fEPSPs de ambos CA1 provocados por el estímulo eléctrico en la comisura ventral hipocámpica. Se observó que las características de los eventos de ambas CA1, tales como la duración, amplitud o la potencia gamma de la señal, no fueron afectadas por la inyección, mostrando la autonomía de cada región CA3 para generar y mantener la actividad oscilatoria gamma (Fig. 24B). Sin embargo, se observaron brotes unilaterales de gamma (Fig. 24C) así como épocas de actividad gamma en las que se perdía la sincronía entre ambos hemisferios (Fig. 24D), fenómeno que nunca se observó en condiciones control. Estas observaciones fueron confirmadas en fragmentos de tiempos mayores (~100 segundos) en los que desapareció la coherencia espectral específicamente en la banda gamma (Fig. 24E), y se redujo la correlación cruzada entre hemisferios (CC: 0.62 ± 0.03 y 0.45 ± 0.05 , en control y tratado, respectivamente; $p < 0.01$, t de Student; $n = 4$ animales; Fig. 24F). Estos resultados confirman que la sincronía entre las oscilaciones gamma (eventos pareados) de ambos CA1 está mediada, al menos en parte, por la conexión existente a través de la comisura ventral hipocámpica.

Aunque, como se ha demostrado previamente, la contribución al LFP de CA1 de las aferencias provenientes de la región CA3 contralateral sea despreciable, sigue siendo una entrada excitadora que provoca una despolarización en las células de CA1. Por tanto, es de esperar que, cuando se producen dos eventos simultáneamente en las regiones CA1 de ambos hemisferios, las neuronas estén recibiendo una excitación mayor que en el caso de eventos unilaterales, en los que sólo reciben excitación de la región CA3 ipsilateral. Para comprobar dicha hipótesis, se analizó el disparo de células piramidales ($n = 73$) e interneuronas ($n = 20$) de la región de CA1 de ambos hemisferios con respecto a la actividad del generador de Schaffer de cada hipocampo ($n = 9$ animales; fragmentos de tiempo de 750-2000 segundos). Para ello, se detectaron los instantes de comienzo de los eventos de los generadores de Schaffer en ambos hemisferios (Fig. 25A) y se cuantificó su relación con el disparo de los distintos tipos de neuronas mediante la elaboración de comodulogramas de disparo (Fig. 25B). Se observó que las células piramidales

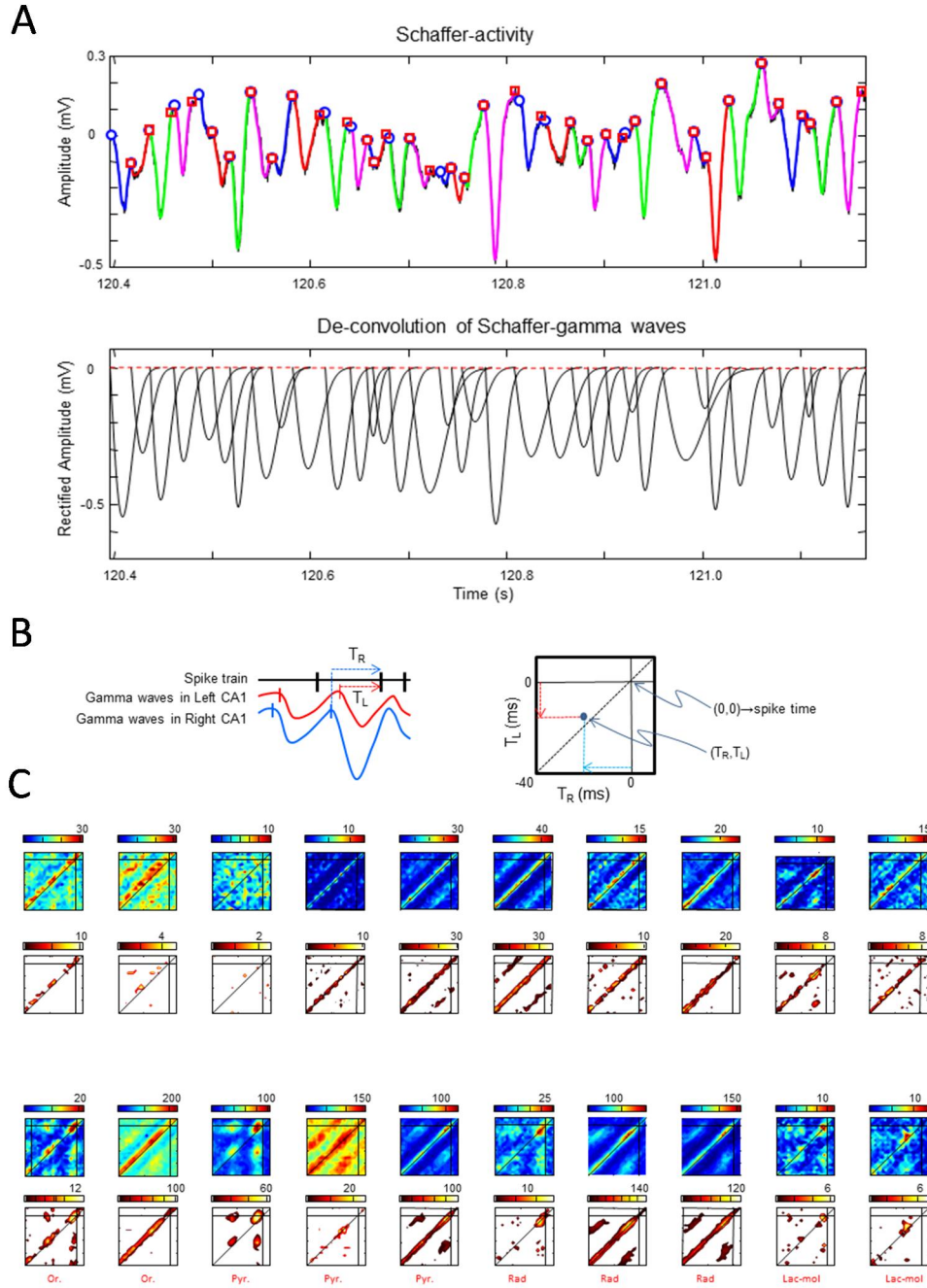


Figura 25. Medida de la relación temporal entre el disparo neuronal y el comienzo de los eventos individuales gamma de ambos hemisferios. **A)** Esquema del método de extracción utilizando deconvolución de LFPs de los eventos individuales gamma a partir del curso temporal del generador de Schaffer (sólo se representa uno de los hemisferios). Panel superior: Fragmento de la evolución temporal del generador de Schaffer (trazo negro) con los eventos detectados mediante descomposición wavelet superpuestos (trazos coloreados), indicando el comienzo (círculo) y final (cuadrado) de cada evento individual. Panel inferior: Eventos individuales obtenidos mediante el método de deconvolución de LFPs que serán utilizados en los subsiguientes análisis (ver Materiales y Métodos). **B)** Panel izquierdo: medida de la relación temporal entre el disparo neuronal (barras verticales negras) y las latencias con respecto a los comienzos de los eventos en el generador de Schaffer del hipocampo izquierdo (barras verticales rojas; T_L) y derecho (Barras verticales azules; T_R). Panel Derecho: Método de representación de las latencias obtenidas (T_L , T_R) con respecto al instante (0,0) correspondiente al disparo de la neurona expresadas como acumulación de eventos (Comodulograma de disparos). **C)** Los comodulogramas de las dos filas superiores se corresponden con 10 células piramidales y las dos inferiores con 10 interneuronas registradas en distintos estratos de CA1 (indicados debajo). Para cada caso, los paneles superiores representan la densidad de eventos en código de colores (de azul a rojo) y los inferiores, los valores significativos (ver Materiales y Métodos). Para el caso de las interneuronas se utilizaron fragmentos de tiempo reducidos para evitar apelmazamiento visual en la representación.

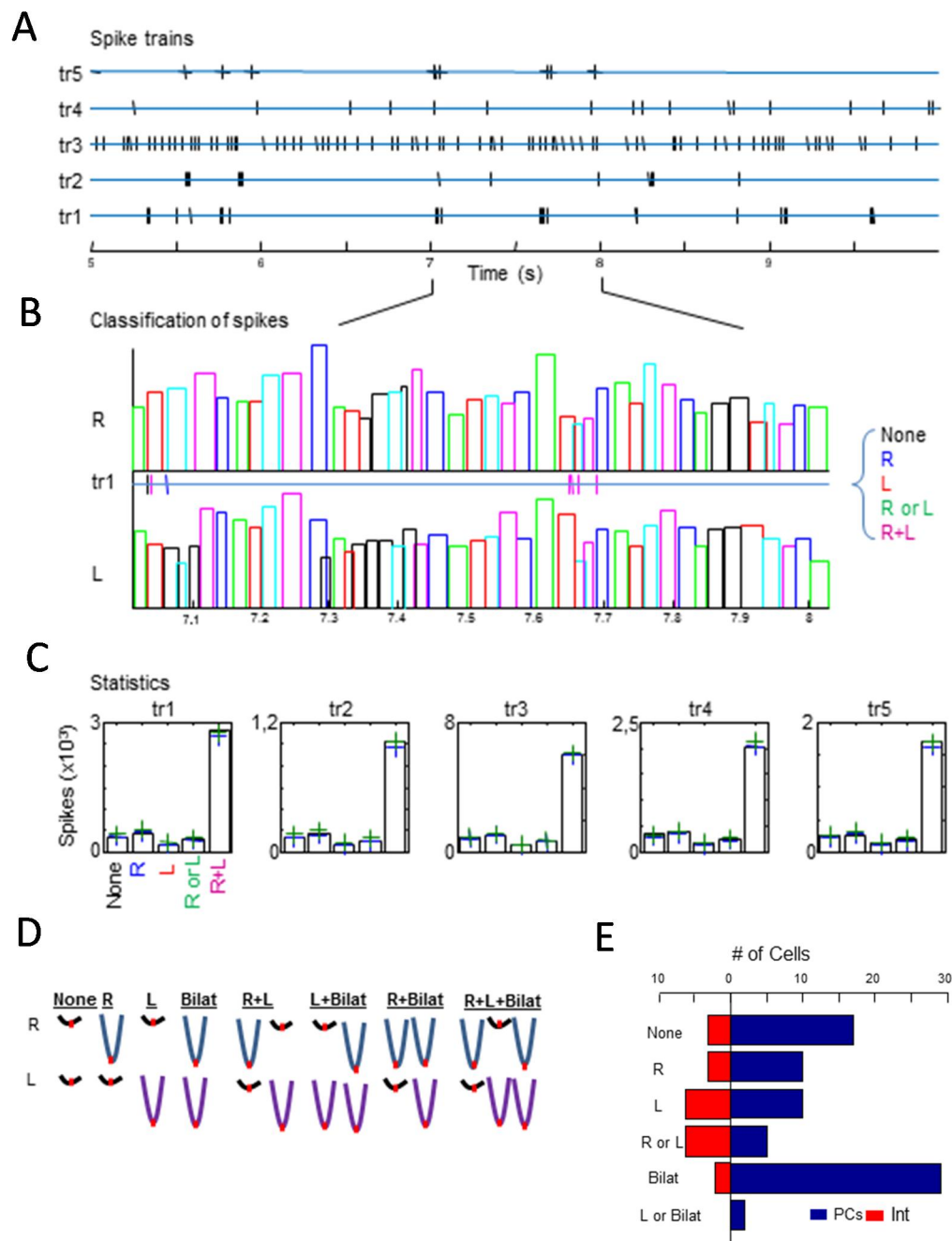


Figura 26. Análisis de la preferencia de disparo de las neuronas con respecto a los eventos gamma de ambos hemisferios. A) Trenes de disparos de diferentes neuronas. **B)** Clasificación de los disparos de las neuronas respecto a la coincidencia o no con eventos unilaterales y bilaterales. **C)** Estadística de los eventos obtenidos. Sólo los valores fuera del intervalo marcado por las cruces azul y verde fueron considerados significativos. **D)** Clasificación de las neuronas en subgrupos excluyentes en función de las preferencias de disparo. **E)** Representación de todas las neuronas en función de su asociación con los eventos unilaterales (sólo R, sólo L, R y L), bilaterales (R y L de forma sincrónica; bilat), o ninguno de ellos (None).

dispararon de forma dispersa a lo largo de las distintas fases del ciclo gamma, lo que implicaría que su actividad no está determinada por la entrada unilateral de ninguno de los hemisferios (Fig. 25C). Sin embargo, las distintas células piramidales dispararon en torno a la diagonal del comodulograma, en intervalos específicos respecto a la aparición de eventos bilaterales, lo que

sugiere que el disparo ocurre en ventanas temporales óptimas para la suma bilateral de eventos (hipótesis comprobada posteriormente). Por el contrario, las interneuronas exhibieron disparos en fases específicas del ciclo gamma con una corta latencia. Además del disparo frecuente sobre la diagonal, que representa el disparo por la conjunción bilateral de eventos, también exhibieron una alta densidad de disparos sobre los ejes del comodulograma, lo que implicaba la existencia de disparos unilaterales.

Para evaluar la significatividad de la preferencia de los disparos de las distintas neuronas con la presencia de eventos sincrónicos en ambos hemisferios se utilizó otro método estadístico (ver Materiales y Métodos). En primer lugar, se clasificaron los disparos individuales de las distintas neuronas en cinco condiciones diferentes por su relación temporal con los distintos eventos o sus combinaciones: evento izquierdo, evento derecho, eventos izquierdo o derecho, eventos izquierdo y derecho (sincronía), y ningún evento (Fig. 26A,B). Posteriormente, se evaluó la significatividad estadística de cada condición para las distintas neuronas (Fig. 26C) y se clasificaron en subgrupos excluyentes en función de las condiciones en las que presentaron disparos significativos (Fig. 26D). Se observó que una gran proporción de células piramidales dispararon preferentemente durante eventos sincrónicos (pareados) en ambos hemisferios, es decir, cuando estarían recibiendo una aferencia excitadora mayor (Fig. 26E). Por el contrario, las interneuronas tendieron a disparar durante eventos ipsilaterales (no pareados), siendo la proporción de interneuronas que dispararon de forma preferente durante eventos bilaterales (pareados) muy pequeña. Esto puede deberse a que las interneuronas son más excitables que las células piramidales por lo que la mera entrada excitadora ipsilateral es suficiente para que se produzca un potencial de acción y la presencia de eventos bilaterales ocurriría en condiciones supraumbrales.

4. DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACIÓN DE UNA LÍNEA BASE EN LAS OSCILACIONES DEL LFP

Una interpretación correcta del LFP requiere de la resolución previa de dos aspectos cruciales: uno técnico, debido a la pérdida del DC de la señal, y otro inherente al propio LFP, puesto que se trata de una mezcla instantánea de los potenciales producidos por distintas aferencias sinápticas. Para hacer frente a estos obstáculos hemos desarrollado un método basado en la implementación de algoritmos de ICA y la inyección local de fármacos. De esta forma, en un primer paso, se obtienen las contribuciones al LFP de las distintas vías sinápticas, requisito indispensable para poder interpretar de manera sencilla y con base celular única y homogénea las fluctuaciones temporales. Posteriormente, mediante la aplicación local de fármacos, se localizan los dominios sinápticos y se determina la polaridad de las corrientes asociadas (naturaleza química excitadora o inhibidora de la vía bajo estudio). El conocimiento de la polaridad de las corrientes nos permite, así, rectificar la señal (añadiendo un *offset* artificial) de forma que para cada vía se recupera la polaridad correcta en cada instante y punto del espacio y se rectifican las amplitudes por la containación variable desde otras entradas. Así, las oscilaciones pueden ser entendidas como eventos sucesivos de una entrada sináptica (inhibidora o excitadora) de las que se conoce el tiempo de inicio de cada ciclo. El conocer hasta tal grado de detalle las oscilaciones es muy enriquecedor a la hora de interpretar cualquier análisis tradicional realizado sobre o con LFPs. Tal es el caso de los análisis de fase de disparos de neuronas (ya sean presinápticas o postsinápticas de uno más relés), para los que la fase deja de ser un dato abstracto y puede ser interpretado de manera fisiológica.

Para el desarrollo del método, nos hemos servido de una vía sináptica bien conocida, como es el caso de la aferencia excitadora de las células piramidales de CA3 a las células piramidales de CA1 a través de los colaterales axónicos de Schaffer. Sin embargo, el conocimiento previo tan sólo ha servido de guía en la búsqueda de las claves biofísicas necesarias para optimizar el método, permitiendo una rápida y fácil interpretación celular de los cambios sufridos en las transformaciones numéricas. Por otra parte, el fundamento biofísico del método hace que sea aplicable a otros casos introduciendo las modificaciones pertinentes requeridas por las particularidades de cada sistema. Como se ha comentado anteriormente, es esencial determinar la localización y la naturaleza química de las sinapsis activadas en cada vía. Este aspecto

implica cierta dependencia de las características del fármaco utilizado, es decir, de su modo de actuación. Si bien las vías excitadoras son menos problemáticas por su bloqueo directo y único con fármacos antagonistas de receptores excitadores, las complejidades conectivas de los circuitos locales pueden producir alteraciones multisinápticas, algunas de las cuales pueden entorpecer la identificación de la vía de interés. Considérese, por ejemplo, el caso de una oscilación del LFP de naturaleza inhibidora; la aplicación de un fármaco bloqueante de receptores GABA, aunque inyectado localmente en la vecindad del punto de registro, puede desencadenar actividad epiléptica que altere la red neuronal estudiada (Benito et al., 2014; Martín-Vázquez et al., 2015). No obstante, el objetivo de este experimento es simplemente determinar la naturaleza sináptica en el instante de la inyección, por lo que los efectos que puedan ocurrir sobre la red neuronal, que requieren cierto tiempo para desarrollarse, pueden ser despreciados. Otro posible escenario relacionado con la aplicabilidad del método a oscilaciones de naturaleza inhibidora es que éstas se vean afectadas tanto por la aplicación de bloqueantes de receptores de Glutamato como de GABA, situación altamente probable dado que las interneuronas están recibiendo aferencias excitadoras en las inmediaciones del punto de inyección (Andersen et al., 1963; Mann et al., 2005; Benito et al., 2014). En este caso es necesario un buen conocimiento de la anatomía de las interneuronas que nos permita localizar el alcance y extensión del árbol dendrítico y del plexo axónico para poder separar en lo posible el efecto de las drogas sobre uno u otro (Cajal 1911; Marín-Padilla, 1990; Fuentealba et al., 2008; Lasztóczy y Klausberger, 2014). Por ejemplo, las interneuronas Or-Lac en la región de CA1 del hipocampo tienen el soma en el *stratum oriens* y plexo axónico en el *stratum lacunosomoleculare*, lo que favorecería la aplicación de este método al estar ambos considerablemente separados (Tukker et al., 2007). La precisión de la extensión de los fármacos en el volumen es, por tanto, crucial; aunque en la célula piramidal de CA1 y la vía Schaffer las fuentes y sumideros de corrientes están moderadamente separadas y se puede limitar con seguridad el volumen afectado por la droga, la difusión de éstas en el estrecho volumen intersticial está suficientemente dificultada como para conseguir concentraciones activas en volúmenes muy pequeños y aun así observar efecto sobre los LFPs. Por ejemplo, se han reportado inyecciones locales restringidas en el *stratum moleculare* de las células granulares del Giro Dentado que no alcanzan la capa somática, donde las distancias son considerablemente menores (Fernández-Ruiz et al., 2013). Recientemente, se han desarrollado nuevos multielectrodos de registro que permiten la liberación *in situ* de sustancias en solución, lo que podría aumentar la precisión espacial del bloqueo de receptores (Altuna et al., 2013).

También puede darse el caso en que dos aferencias sinápticas provenientes de distintas poblaciones neuronales compartan territorio sináptico y topología similar sobre la población postsináptica. Tal situación no permitiría al ICA (en su modalidad espacial) funcionar con

eficiencia, pues vías que generan campos eléctricos con idéntica distribución espacial no se pueden separar mediante ICA espacial, esto es, aparecerían mezcladas en un mismo componente, incluso siendo de naturaleza química distinta. Tal es el caso de las corrientes sinápticas en la región del *stratum lacunosum-moleculare* de CA1 (Benito et al., 2014). Tal componente híbrido tendría un comportamiento dual frente a la inyección de bloqueantes de los receptores GABA y Glutamato. Posiblemente, estos casos complejos podrían resolverse mediante pre-procesamientos que, además de la discriminación espacial, tuviesen en cuenta sus dinámicas temporales, como en el hipotético caso de que sólo una de las aferencias mezcladas en el espacio sea responsable de las oscilaciones.

La variabilidad espacio-temporal de las distintas vías que contribuyen al LFP, hace que los métodos de descomposición en bandas de frecuencia, por sí solos, no se muestren muy eficaces a la hora de estudiar dinámicas de vías específicas (Bullock et al., 1990; Fernández-Ruiz y Herreras, 2013). Una misma población neuronal puede presentar distintos modos de actividad que generen patrones de LFPs en las células postinápticas con diferentes cadencias temporales y, así, ser adscritos a distintas bandas de frecuencia, como ocurre en la región CA3 del hipocampo (Csicsvari et al., 2000; Buzsaki, 2010). Además, la inmensa variabilidad existente en las distintas bandas de frecuencias registradas/definidas en diversos estudios en las mismas o distintas regiones acentúa la evidencia de una inconsistencia en el objeto en sí y la clasificación impuesta artificialmente (Florian et al., 1998; Ray y Maunsell, 2010; Sullivan et al., 2011; Buzsaki y Wang; 2012; Igarashi et al., 2014). Aunque otros métodos han conseguido una cierta separación espacio-temporal de la actividad, no resuelven el problema relacionado con la polaridad de las corrientes subyacentes, lo que lleva a realizar análisis promediados con respecto a una fase arbitraria de la que se desconoce su significado fisiológico (Lopes da Silva et al., 1980; Buzsaki et al., 1986; Kocsis et al., 1999; Belluscio et al., 2012). Por otro lado, la estimación de las fuentes de corrientes mediante el análisis de CSD nos permite localizar los dominios subcelulares de dichas corrientes eliminando las contribuciones conducidas por volumen; sin embargo, no determina unívocamente ni la polaridad ni la vía sináptica específica de dichas corrientes. El CSD representa, en esencia, la misma señal mezclada que constituye el LFP.

Mediante el uso de ICA podemos separar eficientemente las distintas entradas sinápticas que quedan adscritas como componentes independientes específicos de vía. Dichos componentes siguen manteniendo el sesgo AC impuesto por los amplificadores estándares. El conocimiento de la naturaleza de las corrientes nos permite corregir, para cada componente específico individualmente, el componente DC de las oscilaciones mediante la introducción de un *offset* en la amplitud de la evolución temporal. De esta forma obtenemos, para cada vía específica,

dominios subcelulares con corrientes de una misma polaridad, como cabría esperar para una entrada sináptica específica (o sus correspondientes corrientes pasivas). Disponemos, además de la referencia del instante en que comienza cada ciclo de la oscilación y de una amplitud de la oscilación más realista. Este no es en absoluto un problema trivial, pues para una aferencia concreta, la amplitud de las fluctuaciones del LFP dependen del número y el grado de sincronización de las células presinápticas (Elul, 1972; Benito et al., 2014). Así, se ha visto que las células piramidales de CA1 tienden a disparar cuando coinciden con oscilaciones gamma excitadoras originadas por las colaterales de Schaffer con una amplitud mayor que la media (Fernández-Ruiz et al., 2012). La variabilidad en la amplitud de estas oscilaciones estaría representando, así, el mayor o menor tamaño de los clústeres de células que se activan secuencialmente en la región de CA3. La amplitud es por tanto una de las mejores opciones de interpretación con base celular de un LFP, pero es absolutamente necesario tener presente si las oscilaciones tienen una línea base de referencia común y real.

Es necesario hacer hincapié en que con este método no se está recuperando el componente DC del LFP, sino una línea base para las oscilaciones o, dicho de una manera más estricta, el cero de referencia de cada ciclo. El componente DC real de la señal (teniendo en cuenta que se trata de un valor diferencial tal y como se describió en la Introducción) no puede ser recuperado pues no es captado por el registro con multielectrodos, al contrario que en experimentos realizados con electrodos en solución salina introducidos en una pipeta (Gloor et al., 1963; Brankack et al., 1993). Aun así, podría contra-argumentarse que el establecimiento de un cero de referencia absoluto puede presentar muchos problemas y es arbitrario. Es, por tanto, de suma importancia el desarrollo (y uso) futuro de multielectrodos que puedan registrar el componente DC de las señales evitando la polarización del material usado para el registro. En cualquier caso, hemos de recordar que no disponer del componente DC no afecta ni a la distribución espacial ni a la polaridad de las corrientes de los componentes específicos obtenidos con ICA. Si una población neuronal presináptica tuviese una actividad sostenida tal que los potenciales extracelulares producidos por la célula postsináptica se superpusieran hasta el punto de mantenerlo en una amplitud dada (sea el caso de un componente DC producido por una despolarización continuada), la distribución y polaridad de las corrientes serían idénticas a la de una activación transitoria de la misma población. No obstante, se estaría subestimando la magnitud real de las corrientes al perder el valor sostenido del potencial extracelular. Haciendo un símil, el componente AC se asemeja a la línea del horizonte, en la que se pueden observar con precisión las perturbaciones de la línea pero no la amplitud del fondo. Sea como fuere, tanto en AC como en DC se mantiene en cada instante el balance neto de corrientes (sin importar su origen) que entran y salen de las células (Nunez y Srinivasan, 2006).

El conocimiento del inicio de cada ciclo de la oscilación permite estudiar las interacciones entre poblaciones aferentes y postsinápticas, mediante las correlaciones entre el disparo de las neuronas y la evolución temporal de cada componente específico (Fernández-Ruiz et al., 2012a,b). El análisis de fase del disparo de las neuronas, permite hacer una mejor estimación de su relación pre- o postsináptica (mono- o polisinápticas) con respecto a la oscilación del LFP específica de vía en función de la fase preferente. Aunque podrían darse casos que lleven a confusión, tal y como el de una célula postsináptica que dispare en torno a 20 ms desde el inicio del ciclo, esto es, un ciclo completo, dando a entender que se trata de una célula presináptica del ciclo siguiente. Hay que tener presente que la misma neurona puede tener fases medias opuestas para un mismo componente específico dependiendo de si el registro está localizado en el dominio de las corrientes pasivas o activas de la vía específica correspondiente. Esto va a depender de si el perfil de voltaje del componente en cuestión revierte en el eje principal de las células postsinápticas, situación que no tiene por qué ocurrir (Fernández-Ruiz et al., 2013). En el caso en que se utilice el CSD para el análisis de fase, siempre va a producirse un cambio de fase entre los dominios pasivos y activos debido a la reversión en la polaridad de las corrientes.

4.2 DETERMINANTES LOCALES DE LOS LFPs

El conocimiento de los dominios sinápticos de una vía específica, así como su naturaleza química y su polaridad, suponen un primer paso necesario para estudiar el LFP registrado en una determinada región. Sin embargo, aún existen multitud de factores espacio-temporales que afectan a las propiedades del LFP (Elul, 1972; Nunez y Srinivasan, 2006). Factores tales como la morfología celular y la organización tridimensional de la población juegan un papel esencial en la amplitud y polaridad del LFP (Fernández-Ruiz et al., 2013; Benito et al., 2014). Mediante el estudio de los LFPs producidos en distintas regiones por una misma población neuronal, hemos demostrado que, además, existen otros factores funcionales, tales como la sincronización de las corrientes sinápticas, la conducción por volumen entre dichas regiones y la interacción con inhibiciones coactivadas de forma local. Estos factores, juntos con las características estructurales, evidencian la fuerte dependencia del LFP de las propiedades específicas de las poblaciones postsinápticas, siendo paradigmático el caso de estudio en que una misma población de origen produce distintos LFPs. Lejos de afectar sólo a la amplitud y polaridad, se ven afectados otros parámetros tales como la frecuencia o la localización en la que revierte el potencial, lo que influye enormemente en la interpretación del LFP y es causa común de error en la literatura (Colgin et al., 2009).

El estudio en cuestión ha analizado los distintos LFPs producidos por las células piramidales de la región de CA3 en distintas regiones a las que proyecta: las regiones de CA1 ipsi- y

contralateral, la propia región de CA3 y el LS ipsilateral. La actividad espontánea de los clústeres de células de CA3 generan LFPs oscilatorios con frecuencia gamma en la región CA1 ipsilateral a través de los colaterales de Schaffer así como en la propia CA3 mediante las conexiones recurrentes. Sin embargo, la sincronización de ambas oscilaciones no es completa, posiblemente debido a las distintas topologías de los dominios sinápticos y las diferencias morfoelectrónicas de los dos tipos celulares. Por el contrario, en el caso del LS y la región CA1 contralateral, la población de CA3 no genera un LFP apreciable.

Aunque el conocimiento de las bases biofísicas del LFP es suficiente para predecir que una misma actividad aferente puede generar distintos LFPs dependiendo de las características de las poblaciones postinápticas, las posibles situaciones y mecanismos existentes en el cerebro son muy variados y es necesario estudiar cada caso en particular. Mediante el uso de ICA identificamos la contribución de CA3 a la región de CA1 y CA3 ipsilateral, siendo el LFP producido por la entrada de los colaterales de Schaffer a CA1 de mayor amplitud. La localización de las corrientes estimadas en el CSD en el *stratum radiatum* de CA3 hace pensar que se trata de la excitación recurrente de la red de CA3 (Le Duigou et al., 2014), aunque aún serían necesarios realizar experimentos farmacológicos para despejar cualquier posible duda (Benito et al., 2014). Sin embargo, no observamos una contribución apreciable en el LS, donde la mayor parte de la potencia del LFP registrado localmente pertenece a dos fuentes lejanas que posiblemente son, por sus características temporales, el hipocampo y la corteza cerebral. Esto tan sólo indica que las condiciones de la entrada sináptica de las células piramidales de CA3 a las células del LS no son óptimas para la generación de LFP, pero no es indicativo de ineficiencia en la excitación como tal. De hecho, una estimulación eléctrica de baja intensidad en la región CA3 produce espigas poblacionales (e incluso eventos disinápticos) en el LS, aun cuando el potencial de campo en CA1 es mínimo. Además, eventos de máxima sincronización espontánea en CA3, como son las Sharp Waves, sí se pueden apreciar en el LS, y con dinámica temporal distinta que asegura que no se deben a conducción por volumen desde aquella.

En el caso de la región CA1 contralateral la contribución también fue inapreciable, sin embargo, el estudio presentó diversos problemas adicionales que se discutirán posteriormente. Tanto para el caso de la región de CA1 contralateral como para el LS, y debido a la poca contribución al LFP que suponían, se hizo necesario el uso de modelos computacionales para un correcto estudio, pues el abordaje experimental no proporciona resolución suficiente. Usando modelos, era fácil implementar un mismo patrón temporal como señal de entrada tanto a los constructos de CA1 como del LS, por lo que los resultados podían ser interpretados en términos postsinápticos, sin las complicaciones surgidas por la topología conectiva o por la presencia de coactivaciones con otras vías. Además, aunque la magnitud y sincronización de la entrada son

parámetros importantes, los factores espaciales, tales como la morfología celular, la configuración de los dominios sinápticos y la disposición poblacional, serán limitantes, y por tanto decisivos en la producción de LFP. Tal es el caso de las células del LS, cuyo pequeño tamaño supone la inyección de una cantidad neta de corriente al espacio extracelular menor que en el caso de las células piramidales. Su estructura dendrítica parcialmente radial genera campos eléctricos semicerrados cuya extensión espacial es muy limitada. Asimismo, las células se disponen de forma dispersa, sin una alineación clara por lo que las corrientes positivas y negativas de unas y otras tenderán a cancelarse al superponerse en el espacio extracelular.

Hasta ahora, se pensaba que el LFP registrado en el *stratum radiatum* de CA1 era, en gran parte, una mezcla de las entradas ipsi- y contralateral de CA3 (Buzsaki et al., 1983; Suzuki y Smith, 1987; 1988). De hecho, la alta sincronía y fuerte solapamiento de los dominios sinápticos de ambas entradas hacen plausible la existencia de una contribución mixta de origen bilateral. La alta sincronía de ambas entradas podría hacer que el ICA no los reconociese como eventos independientes y se diese el caso de que el componente de Schaffer fuera realmente una mezcla de ambas aferencias con un perfil espacial compuesto. No obstante, las evidencias obtenidas apuntan en otra dirección. Por ejemplo, al extraer los componentes específicos de la vía de Schaffer en cada hemisferio se aprecian ciertas discrepancias, al observarse eventos oscilatorios presentes en uno solo de los hemisferios. Estos eventos unilaterales no serían posibles si tanto los colaterales de Schaffer como las ramificaciones comisurales produjeran LFPs de amplitud similar en uno y otro lado. Además, los perfiles de LFPs espontáneos difieren cualitativamente de los perfiles de los potenciales provocados obtenidos al estimular la región CA3 contralateral. Y, quizás, la evidencia más clara, deriva del hecho de que tras la inactivación unilateral de una de las zonas mediante la inyección de fármacos, la potencia del componente Schaffer contralateral permanece inalterada. Por tanto, la aferencia de la región de CA3 contralateral estaría inyectando al espacio extracelular de CA1 una corriente que contribuye de forma insignificante al LFP, al menos durante la baja sincronización necesaria para generar las ondas gamma. Además, los axones de la región CA3 contralateral hacen sinapsis preferentemente en las dendritas basales de CA1, a diferencia de la aferencia ipsilateral que realiza contactos sinápticos con mayor densidad en las dendritas apicales (Shinohara et al., 2012). Esta distribución hace más propicia la producción de LFP para la entrada ipsilateral. Curiosamente, a pesar de que los axones ipsilaterales también tienen terminaciones en las dendritas basales no se observan corrientes negativas basales ni en las oscilaciones gamma espontáneas ni en los potenciales provocados de baja intensidad. De hecho, la proporción de axones que terminan en las dendritas basales y apicales varían en el eje septo-temporal, debido a que se originan en distintos sectores de la región de CA3, por lo que se esperarían distintos perfiles al estimular eléctricamente grupos pequeños de axones de CA3 (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994; Roth y

Leung, 1995; Leung y Pélouquin, 2010). En cambio, se han observado sumideros basales de corta latencia tras la estimulación específica de la zona basal de CA1 ipsilateral o CA3 contralateral (Buzsaki y Eidelberg, 1982a; Kaibara y Leung, 1993).

En este trabajo, al menos en el caso de la estimulación contralateral, hemos demostrado que el potencial provocado está mezclado con una fuente activa somática debido a que, 1) existe cierta independencia entre estímulos en los potenciales somáticos y apicales, 2) el incremento de la intensidad en los estímulos ipsi- y contralateral conlleva dinámicas distintas en los potenciales de las regiones basal y somática, y 3) el bloqueo de los receptores GABA_A produce la desaparición del sumidero basal, de lo que se infiere su naturaleza pasiva. Por otro lado, es de esperar que esta mezcla de corrientes excitadoras e inhibitoras modifique el alcance intracelular de las mismas (Liu, 2004; Willadt et al., 2013). Esto puede explicar la discrepancia entre los perfiles espontáneos y aquellos provocados por estimulación eléctrica, ya que en el caso del potencial provocado se reclutarían un gran número de interneuronas que se activarían de forma sincrónica, generando una corriente inhibitoria apreciable (Andersen et al., 1963; Buzsaki, 1984; Klausberger y Somogyi, 2005). Además, esto demuestra que la utilización indistinta del potencial somático provocado por el estímulo comisural como reflejo del EPSP dendrítico sería errónea (Herreras et al., 1987; Dragoi y Buzsaki, 2003).

Cabe destacar la importancia que supone la conducción por volumen entre dos regiones cercanas cuyas señales mantienen una cierta coherencia en el tiempo. En este caso, los LFPs producidos por CA3 sobre la propia CA3 y la región CA1 ipsilateral, mantienen una alta correlación temporal, pues los axones son comunes y su longitud similar. La entrada ipsilateral de CA3 a CA1 es predominantemente negativa en las dendritas apicales y ligeramente positiva en la región somática de CA1, sin embargo las estimaciones computacionales predecían un dipolo positivo/negativo más simétrico con reversión a unas 100 μm debajo de la capa somática. Al incluir en el modelo la región de CA3, cuya negatividad en las dendritas apicales de CA3 se propaga por volumen hasta CA1 introduciendo potencial negativo en todos sus puntos, los potenciales se suman a los locales y se obtiene un perfil muy similar al registrado experimentalmente. Es importante destacar que en este proceso se ven afectados tanto la amplitud como la profundidad de reversión del potencial y el ratio de positividad/negatividad, todos ellos parámetros de caracterización típicos de LFPs. Aunque en este caso, la rectificación sólo concierne a fuentes con un fuerte acoplamiento de fase, la existencia de múltiples osciladores en el hipocampo con actividad en la frecuencia gamma puede llevar a confusión en la identificación y estudio dinámico de los distintos generadores que se verán acoplados de forma variable y en momentos desconocidos (Makarov et al., 2010; Schomburg et al., 2014; Lasztóczy y Klausberger, 2014).

Por último, hay que resaltar la importancia del cerebro como estructura bilateral en cuanto a procesamiento de información se refiere. Concretamente del hipocampo ya se conoce desde hace tiempo, a raíz de estudios anatómicos, que existen interconexiones entre los hipocampos de ambos hemisferios a través de la comisura ventral hipocámpica (Blackstad, 1956; Van Groen y Wyss, 1988). Este tracto conecta principalmente las células de CA3 entre sí, y con las células de CA1 (Bliss et al., 1983; Queiroz and Mello, 2007) y de CA2/CA3 del hipocampo contralateral (Laurberg et al., 1979), aunque también hay fibras provenientes del Giro Dentado, así como del presubículo y la corteza entorrinal que cruzan a través de la comisura dorsal hipocámpica (Demeter et al., 1985). Posteriormente, y a partir de estudios funcionales, se observó que, en particular, las regiones de CA3 de ambos hipocampos están fuertemente conectadas funcionalmente. Tanto *in vivo* (Fernandez de Lima et al., 1990) como *in vitro*, se observó que las descargas epilépticas provocadas en un hipocampo eran transferidas al otro, siendo la actividad bilateral perfectamente sincrónica y dependiente de la comisura ventral hipocámpica. También existen evidencias que apuntan a una fuerte conexión interhemisférica en cuanto a actividad espontánea se refiere; se ha visto que las oscilaciones theta y gamma están acopladas en ambos hipocampos (Buzsaki et al., 2013; Shinohara et al., 2013) y que los eventos Sharp Wave ocurrían de forma simultánea en ambos hemisferios (Buzsaki et al., 1990; Suzuki y Smith, 1987; Buzsaki et al., 2003). Sin embargo, se desconoce hasta qué punto ambos hipocampos procesan la misma información de manera autónoma, si lo hacen de forma dependiente o si es complementaria. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la actividad de ambas regiones de CA3 exhibe una alta sincronía dependiente de la conexión comisural. Aunque esto no excluye la existencia de posibles aferencias comunes a ambos hemisferios, sí evidencia la dependencia bilateral de los circuitos de la región de CA3. Además, se demuestra que la existencia de esta alta sincronía favorece el disparo de las células piramidales de CA1, debido a que estarían recibiendo entradas excitadoras simultáneas ipsi- y contralateral. Estos resultados indicarían que los circuitos de CA3-CA1 estarían funcionando como un conglomerado bilateral más que como una entidad unilateral independiente del otro hemisferio.

Globalmente, los resultados presentados en esta Memoria vienen a actualizar los conocimientos teóricos sobre las bases celulares del LFP y ponen de manifiesto sus problemas bien conocidos por los biofísicos y teóricos que, sin embargo, son habitualmente despreciados o ignorados. Las interpretaciones simplistas que eluden estos problemas se encuentran en altísima proporción incluso en la literatura de autores reconocidos en revistas de prestigio, lo que favorece la perpetuación del mencionado desinterés. El carácter espacial de los campos eléctricos es

ineludible, también en el cerebro, y su omisión puede llevar a malinterpretaciones que comprometen, en mayor o menor grado, resultados e interpretaciones.

4. CONCLUSIONES

1. La combinación del análisis de componentes independientes junto con el abordaje farmacológico de su origen químico permite recuperar la línea base de las oscilaciones del LFP registrado en AC mediante dispositivos multielectrodos, obteniéndose así la amplitud y polaridad correcta de las mismas.
2. La aferencia sináptica de las células piramidales de la región de CA3 a las células piramidales de la región de CA1 contralateral produce un LFP despreciable, siendo mayoritaria la contribución de la aferencia ipsilateral.
3. La aferencia sináptica de las células piramidales de CA3 a las células del Septum lateral ipsilateral produce un LFP de amplitud mínima, perteneciendo la mayor parte de la varianza a potenciales lejanos conducidos por volumen.
4. Los potenciales provocados en la región de CA1 por la estimulación eléctrica de las regiones de CA3 ipsi- y contralateral activan, de manera diferencial, interneuronas de CA1, modificando la distribución de corrientes excitadoras en ambos casos.
5. La simultaneidad y cercanía espacial de las oscilaciones gamma generadas en las células piramidales de la región de CA3 y CA1, producidas por las aferencias bifurcadas de los mismos axones de las células piramidales de la región de CA3, modifica, por conducción en el volumen, el perfil espacial de las oscilaciones de CA1, afectando a su polaridad y amplitud.
6. Las células piramidales de CA1 disparan preferentemente cuando la actividad de las regiones de CA3 de ambos hemisferios es sincrónica. Dicha sincronía es dependiente de la conexión interhemisférica a través de la comisura ventral hipocampal.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alonso JR, Frotscher M (1989) Organization of the septal region in the rat brain: a Golgi/EM study of lateral septal neurons. *J Comp Neurol* 286:472–487

Altuna A, Bellistri E, Cid E, Aivar P, Gal B, Berganzo J, Gabriel G, Guimerà A, Villa R, Fernández LJ, Menendez de la Prida L (2013) SU-8 based microprobes for simultaneous neural depth recording and drug delivery in the brain. *Lab Chip* 13:1422-1430

Andersen P, Eccles JC, Loynning Y (1963) Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of the inhibitory cell and its synapses. *Nature* 198:540-542

Bannister NJ, Larkman AU (1995a) Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns. *J Comp Neurol* 360:150–160

Bannister NJ, Larkman AU (1995b) Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: II. Spine distributions. *J Comp Neurol* 360:161–171

Bédard C, Destexhe A (2009) Macroscopic models of local field potentials and the apparent 1/f noise in brain activity. *Biophys J* 96:2589-2603.

Bédard C, Destexhe A (2011) Generalized theory for current-source-density analysis in brain tissue. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 84:041909.

Bédard C, Kröger H, Destexhe A (2006) Model of low-pass filtering of local field potentials in brain tissue. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 73:051911

Belluscio MA, Mizuseki K, Schmidt R, Kempter R, Buzsáki G (2012) Cross-frequency phase-phase coupling between θ and γ oscillations in the hippocampus. *J Neurosci* 32:423-435

Benito N, Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Makarova J, Korovaichuk A, Herreras O (2014) Spatial modules of coherent activity in pathway-specific LFPs in the hippocampus reflect topology and different modes of presynaptic synchronization. *Cereb Cortex* 24:1738-1752

Berger H (1929) Über das Elektroenzephalogramm des Menschen. *Arch Psychiatr Nerven* 87:527-570

- Blackstad TW (1956) Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol* 105:417–537
- Bliss TV, Lancaster B, Wheal HV (1983) Long-term potentiation in commissural and Schaffer projections to hippocampal CA1 cells: an in vivo study in the rat. *J Physiol* 341:617–626
- Boss BD, Turlejski K, Stanfield BB, Cowan WM (1987) On the numbers of neurons in fields CA1 and CA3 of the hippocampus of Sprague-Dawley and Wistar rats. *Brain Res* 406:280–287
- Bower JM, Beeman D (1998) *The Book of Genesis. Exploring Realistic Neural Models with the GENeral NEural Simulation System*. 2nd ed. New York: Springer
- Bragin A, Jandó G, Nádasdy Z, Hetke J, Wise K et al. (1995) Gamma (40–100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15:47–60
- Brankack J, Stewart M, Fox SE (1993) Current source density analysis of the hippocampal theta rhythm: associated sustained potentials and candidate synaptic generators. *Brain Res* 615:310–327
- Bressler SL (1987) Relation of olfactory bulb and cortex. I. Spatial variation of bulbocortical interdependence. *Brain Res* 409:285–293
- Bressler SL, Coppola R, Nakamura R (1993) Episodic multiregional cortical coherence at multiple frequencies during visual task performance. *Nature* 366:153–156
- Bullock TH, Mcclune MC, Enright JT (2003) Are the electroencephalograms mainly rhythmic? Assessment of periodicity in wide-band time series. *Neuroscience* 121:233–25
- Buzsáki G (1984) Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog Neurobiol* 22:131–153
- Buzsáki G (2010) Neural syntax: cell assemblies, synapsembles, and readers. *Neuron* 68:362–385
- Buzsáki G, Buhl DL, Harris KD, Csicsvari J, Czéh B, Morozov A (2003) Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience* 116:201–211
- Buzsáki G, Czopf J, Kondákor I, Kellényi L (1986) Laminar distribution of hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat: current-source density analysis, effects of urethane and atropine. *Brain Res* 365:125–137
- Buzsáki G, Eidelberg E (1982a) Convergence of associational and commissural pathways on CA1 pyramidal cells of the rat hippocampus. *Brain Res* 237:283–295

- Buzsáki G, Eidelberg E (1982b) Direct afferent excitation and longterm potentiation of hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* 48:597–607
- Buzsáki G, Leung LW, Vanderwolf CH (1983) Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res* 287:139-171
- Buzsáki G, Wang XJ (2012) Mechanisms of gamma oscillations. *Annu Rev Neurosci* 35:203-225
- Cajal S (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Vol II.* Paris: Maloine
- Canals S, López-Aguado L, Herreras O (2005) Synaptically-recruited apical currents are required to initiate axonal and apical spikes in hippocampal pyramidal cells: modulation by inhibition. *J Neurophysiol* 93:909–918
- Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA (2004) Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3662-3667
- Castro-Alamancos MA (2000) Origin of synchronized oscillations induced by neocortical disinhibition in vivo. *J Neurosci* 20:9195-9206
- Chawla D, Friston KJ, Lumer ED (2001) Zero-lag synchronous dynamics in triplets of interconnected cortical areas. *Neural Netw* 14:727–735
- Chee SS, Menard JL, Dringenberg HC (2015) The lateral septum as a regulator of hippocampal theta oscillations and defensive behavior in rats. *J Neurophysiol*. doi:10.1152/jn.00806.2014
- Chen A (2006) Fast kernel density independent component analysis. *Lecture Notes Comput Sci* 3889:24–31
- Choi S, Cichocki A, Park HM, Lee SY (2005) Blind source separation and independent component analysis: a review. *Neur Inf Process Let Rev* 6:1–57
- Cole K (1968) *Membranes, Ions and Impulses.* Berkeley: University of California Press.
- Cole KS (1935) Electrical impedance of suspensions of Hipponee eggs. *Journal of general Physiology* 18:877-887

Colgin LL, Denninger T, Fyhn M, Hafting T, Bonnevie T, Jensen O, Moser MB, Moser EI (2009) Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature* 462:353-357

Colgin LL, Denninger T, Fyhn M, Hafting T, Bonnevie T, Jensen O, Moser MB, Moser EI (2009) Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature* 462:353-357

Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Buzsáki G (1998) Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. *Neuron* 21:179-189

Csicsvari J, Hirase H, Mamiya A, Buzsáki G (2000) Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron* 28:585-594

Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G (2003) Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron* 37:311-322

DeFrance JF, Kitai ST, Shimono T (1973) Electrophysiological analysis of the hippocampal-septal projections. I. Response and topographical characteristics. *Exp Brain Res* 17:447-462

Dehghani N, Bédard C, Cash SS, Halgren E, Destexhe A (2010) Comparative power spectral analysis of simultaneous electroencephalographic and magnetoencephalographic recordings in humans suggests non-resistive extracellular media: EEG and MEG power spectra. *J Comput Neurosci* DOI:10.1007/s10827-010-0252-5

Demeter S, Rosene DL, Van Hoesen GW (1985) Interhemispheric pathways of the hippocampal formation, presubiculum, and entorhinal and posterior parahippocampal cortices in the rhesus monkey: the structure and organization of the hippocampal commissures. *J Comp Neurol* 233:30-47

Denker M, Roux S, Lindén H, Diesmann M, Riehle A, Grün S (2011) The local field potential reflects surplus spike synchrony. *Cereb Cortex* 21:2681-2695

Dragoi G, Harris KD, Buzsáki G (2003) Place representation within hippocampal networks is modified by long-term potentiation. *Neuron* 39:843-853

Eckhorn R, Bauer R, Jordan W, Brosch M, Kruse W, Munk M, Reitboeck HJ (1988) Coherent oscillations: a mechanism of feature linking in the visual cortex? Multiple electrode and correlation analyses in the cat. *Biol Cybern* 60:121-130

Einevoll GT, Kayser C, Logothetis NK, Panzeri S (2013) Modelling and analysis of local field potentials for studying the function of cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 14:770-785

Elul R (1971) The genesis of the EEG. *Int Rev Neurobiol* 15:228–272

Fernandes de Lima VM, Pijn JP, Nunes Filipe C, Lopes da Silva F (1990) The role of hippocampal commissures in the interhemispheric transfer of epileptiform afterdischarges in the rat: a study using linear and non-linear regression analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 76:520-539

Fernández-Ruiz A, Herreras O (2013) Identifying the synaptic origin of ongoing neuronal oscillations through spatial discrimination of electric fields. *Front Comput Neurosci* 7:5

Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Benito N, Herreras O (2012a) Schaffer-specific local field potentials reflect discrete excitatory events at gamma frequency that may fire postsynaptic hippocampal CA1 units. *J Neurosci* 32:5165-5176

Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Herreras O (2012b) Sustained increase of spontaneous input and spike transfer in the CA3-CA1 pathway following long-term potentiation in vivo. *Front Neural Circuits* 6:71

Fernández-Ruiz A, Muñoz S, Sancho M, Makarova J, Makarov VA, Herreras O (2013) Cytoarchitectonic and dynamic origins of giant positive local field potentials in the dentate gyrus. *J Neurosci* 33:15518-15532.

Finnerty GT, Jefferys JG (1993) Functional connectivity from CA3 to the ipsilateral and contralateral CA1 in the rat dorsal hippocampus. *Neuroscience* 56:101–108

Florian G, Andrew C, Pfurtscheller G (1998) Do changes in coherence always reflect changes in functional coupling? *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 106:87-91

Freeman JA, Nicholson C (1975) Experimental optimization of current source-density technique for anuran cerebellum. *J Neurophysiol* 38:369-382

Freeman WJ (1978) Spatial properties of an EEG event in the olfactory bulb and cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 44:586-605

Fuentealba P, Begum R, Capogna M, Jinno S, Márton LF, Csicsvari J, Thomson A, Somogyi P, Klausberger T (2008) Ivy cells: a population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity. *Neuron* 57:917-929

Gabriel et al (1996)

Gabriel S, Lau RW, Gabriel C (1996) The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. *Phys Med Biol* 41(11):2251-2269

Geselowitz DB (1967) On bioelectric potentials in an inhomogeneous volume conductor. *Biophys J* 7:1-11

Gloor P, Vera CL, Sperti L (1963) Electrophysiological studies of hippocampal neurons I. Configuration and laminar analysis of the “resting” potential gradient of the main transient response to perforant path, fimbrial and mossy fiber volleys and of “spontaneous” activity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 15:353-378

Golarai G, Sutula TP (1996) Bilateral organization of parallel and serial pathways in the dentate gyrus demonstrated by current-source density analysis in the rat. *J Neurophysiol* 75:329-342

Héja L, Nyitrai G, Kékesi O, Dobolyi A, Szabó P, Fiáth R, Ulbert I, Pál-Szenthe B, Palkovits M, Kardos J (2012) Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons. *BMC Biol* 10:26

Herreras O (1990) Propagating dendritic action potential mediates synaptic transmission in CA1 pyramidal cells in situ. *J Neurophysiol* 64:1429-1441

Herreras O, Makarova J, Makarov VA (2015) New uses of LFPs: Pathway-specific threads obtained through spatial discrimination. *Neuroscience* 310:486-503.

Herreras O, Solís JM, Martín del Río R, Lerma J (1987) Characteristics of CA1 activation through the hippocampal trisynaptic pathway in the unanaesthetized rat. *Brain Res* 413:75–86

Herreras O, Solís JM, Muñoz MD, Martín del Río R, Lerma J (1988) Sensory modulation of hippocampal transmission. I. Opposite effects on CA1 and dentate gyrus synapsis. *Brain Res* 451:290–302

Hramov AE, Makarov VV, Koronovskii AA, Kurkin SA, Gaifullin MB, Alexeeva NV, Alekseev KN, Greenaway MT, Fromhold TM, Patané A, Kusmartsev FV, Maksimenko VA, Moskalenko OI, Balanov AG (2014) Subterahertz chaos generation by coupling a superlattice to a linear resonator. *Phys Rev Lett* 112:116603

Hutchison RM, Mirsattari SM, Jones CK, Gati JS, Leung LS (2010) Functional networks in the anesthetized rat brain revealed by independent component analysis of resting-state fMRI. *J Neurophysiol* 103:3398–3406

- Ibarz JM, Makarova J, Herreras O (2006) Relation of apical dendritic spikes to output decision in CA1 pyramidal cells during synchronous activation: a computational study. *Eur J Neurosci* 23:1219–1233
- Igarashi KM, Lu L, Colgin LL, Moser MB, Moser EI (2014) Coordination of entorhinal-hippocampal ensemble activity during associative learning. *Nature* 510:143–147
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 295:580–623
- Jakab RL, Leranth C (1990) Somatospiny neurons in the rat lateral septal area are targets of hippocamposeptal fibers: a combined EM/Golgi and degeneration study *Synapse* 6:12–22
- Kaibara T, Leung LS (1993) Basal versus apical dendritic long-term potentiation of commissural afferents to hippocampal CA1: a current source density analysis. *J Neurosci* 13:2391–2404
- Kajikawa Y, Schroeder CE (2011) How local is the local field potential? *Neuron* 72:847–858
- Ketchum KL, Haberly LB (1993) Synaptic events that generate fast oscillations in piriform cortex. *J Neurosci* 13:3980–3985
- Kocsis B, Bragin A, Buzsáki G (1999) Interdependence of Multiple Theta Generators in the Hippocampus: a Partial Coherence Analysis. *J Neurosci* 19:6200–6212
- Korovaichuk A, Makarova J, Makarov VA, Benito N, Herreras O (2010) Minor contribution of principal excitatory pathways to hippocampal LFPs in the anesthetized rat: a combined independent component and current source density study. *J Neurophysiol* 104:484–497
- Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J, Varela FJ (1999) Measuring phase synchrony in brain signals. *Human Brain Mapp* 8:194–208
- Lasztóczy B, Klausberger T (2014) Layer-specific GABAergic control of distinct gamma oscillations in the CA1 hippocampus. *Neuron* 81:1126–1139
- Laurberg S (1979). Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 184:685–708
- Le Duigou C, Simonnet J, Teleńczuk MT, Fricker D, Miles R (2014) Recurrent synapses and circuits in the CA3 region of the hippocampus: an associative network. *Front Cell Neurosci* 7:262

- Łęski S, Lindén H, Tetzlaff T, Pettersen KH, Einevoll GT (2013) Frequency dependence of signal power and spatial reach of the local field potential. *PLoS Comput Biol* 9:e1003137.
- Leung LS, Péloquin P (2010) Cholinergic modulation differs between basal and apical dendritic excitation of hippocampal CA1 pyramidal cells. *Cereb Cortex* 20:1865–1877
- Leung LS, Peloquin P, Canning KJ (2008) Paired-pulse depression of excitatory postsynaptic current sinks in hippocampal CA1 in vivo. *Hippocampus* 18:1008–1020
- Libet B, Gerard RW (1939) Control of the potential rhythm of the isolated frog brain. *J Neurophysiology* 2:153:169
- Lindén H, Tetzlaff T, Potjans TC, Pettersen KH, Grün S, Diesmann M, Einevoll GT (2011) Modeling the spatial reach of the LFP. *Neuron* 72:859–872
- Liu G (2004) Local structural balance of functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. *Nat Neurosci* 7:373–379
- Logothetis NK, Kayser C, Oeltermann A (2007) In vivo measurement of cortical impedance spectrum in monkeys: implications for signal propagation. *Neuron* 55:809-823
- Lopes da Silva F (1991) Neural mechanisms underlying brain waves: from neural membranes to networks. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 79:81-93
- Lopes da Silva FH, Vos JE, Mooibroek J, Van Rotterdam A (1980) Relative contributions of intracortical and thalamo-cortical processes in the generation of alpha rhythms, revealed by partial coherence analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 50:449-456
- López-Aguado L, Ibarz JM, Herreras O (2001) Activity-dependent changes of tissue resistivity in the CA1 region in vivo are layer-specific: modulation of evoked potentials. *Neuroscience* 108:249–262
- Lorente de Nó R (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 46:113-177
- Lorente de No R (1947) Action potential of the motoneurons of the hypoglossus nucleus. *J Cell Physiol* 29:207-287
- Makarov VA, Makarova J, Herreras O (2010) Disentanglement of local field potential sources by independent component analysis. *J Comput Neurosci* 29:445-457
- Makarova J, Ibarz JM, Makarov VA, Benito N, Herreras O (2011) Parallel readout of pathway-specific inputs to laminated brain structures. *Front Syst Neurosci* 5:77

- Makarova J, Makarov VA, Herreras O (2010) A model of sustained field potentials based on gradients of polarization in single neurons. *J Neurophysiol* 103:2446-2457
- Makarova J, Ortuño T, Korovaichuk A, Cudeiro J, Makarov VA, Rivadulla C, Herreras O (2014) Can pathway-specific LFPs be obtained in cytoarchitectonically complex structures? *Front Syst Neurosci* 8:66.
- Makeig S, Jung TP, Bell AJ, Ghahremani D, Sejnowski TJ (1997) Blind separation of auditory event-related brain responses into independent components. *PNAS* 94:10979–10984
- Malmivuo J, Plonsey R (1995) *Bioelectromagnetism*. New York: New York University Press.
- Mann EO, Suckling JM, Hajos N, Greenfield SA, Paulsen O (2005) Perisomatic feedback inhibition underlies cholinergically induced fast network oscillations in the rat hippocampus in vitro. *Neuron* 45:105-111
- Marín-Padilla M (1990) The pyramidal cell and its local-circuit interneurons: a hypothetical unit of the Mammalian cerebral cortex. *J Cogn Neurosci* 2:180-194
- Marowsky A, Rudolph U, Fritschy JM, Arand M (2012) Tonic inhibition in principal cells of the amygdala: a central role for $\alpha 3$ subunit-containing GABAA receptors. *J Neurosci* 32:8611-8619
- Marr D (1969) A theory of cerebellar cortex. *J Physiol* 202:437-470
- Marr D (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262:23-81
- Martín-Vázquez G, Benito N, Makarov VA, Herreras O, Makarova J (2015) Diversity of LFPs Activated in Different Target Regions by a Common CA3 Input. *Cereb Cortex pii: bhv211*
- Martín-Vázquez G, Makarova J, Makarov VA, Herreras O (2013) Determining the true polarity and amplitude of synaptic currents underlying gamma oscillations of local field potentials. *PLoS One* 8:e75499
- Maxwell JC (1865) A dynamical theory of the electromagnetic field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 155:459-512
- McBain CJ, Traynelis SF, Dingledine R (1990) Regional variation of extracellular space in the hippocampus. *Science* 249:674-677.
- McLennan H, Miller JJ (1974) The hippocampal control of neuronal discharges in the septum of the rat. *J Physiol* 237:607–624

- McNaughton BL, Morris RGM (1987) Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends in Neurosciences* 10:408-415
- McNaughton BL, Nadel L (1989) Hebb-Marr networks and the neurobiological representation of action in space. In: *Neuroscience and connectionist theory*; Gluck MA, Rumelhart DE (eds), 1-64, NJ: Lawrence Erlbaum Associates Inc
- McNaughton N, Miller JJ (1986) Collateral specific long term potentiation of the output of field CA3 of the hippocampus of the rat. *Exp Brain Res* 62:250–258
- Mitzdorf U, Singer W (1977) Laminar segregation of afferents to lateral geniculate nucleus of the cat: an analysis of current source density. *J Neurophysiol* 40:1227-1244
- Montgomery SM, Buzsáki G (2007) Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14495-14500
- Neville KR, Haberly LB (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol* 90:3921-3930
- Nunez PL, Srinivasam R (2006) *Electric Fields of the Brain: The Neurophysics of EEG*. 2nd Edition. New York: Oxford University Press. New York
- Panula P, Revuelta AV, Cheney DL, Wu JY, Costa E (1984) An immunohistochemical study on the location of GABAergic neurons in rat septum. *J Comp Neurol* 222:69–80
- Pavlov AN, Makarov VA, Mosekilde E, Sosnovtseva OV (2006) Application of wavelet-based tools to study the dynamics of biological processes. *Brief Bioinform* 7:375-389
- Pavlov I, Savtchenko LP, Kullmann DM, Semyanov A, Walker MC (2009) Outwardly rectifying tonically active GABAA receptors in pyramidal cells modulate neuronal offset, not gain. *J Neurosci* 29:15341-15350
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, London
- Pedemonte M, Barrenechea C, Núñez A, Gambini JP, García-Austt E (1998) Membrane and circuit properties of lateral septum neurons: relationships with hippocampal rhythms. *Brain Res* 800:145–153
- Plonsey R, Heppner DB (1967) Considerations of quasi-stationarity in electrophysiological systems. *Bull Math Biophys* 29:657-664
- Plonsey R. 1969. *Bioelectric phenomena*, New York: McGraw-Hill.

- Polk C, Postow E (1986) CRC Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields, Boca Raton, FL: CRC Press.
- Queiroz CM, Mello LE (2007) Synaptic plasticity of the CA3 commissural projection in epileptic rats: an in vivo electrophysiological study. *Eur J Neurosci* 25:3071-3079
- Rajagovindan R, Ding M (2008) Decomposing neural synchrony: toward an explanation for near-zero phase-lag in cortical oscillatory networks. *PLoS One* 3:e3649
- Rappelsberger P, Pockberger H, Petsche H (1981) Current source density analysis: methods and application to simultaneously recorded field potentials of the rabbit's visual cortex. *Pflügers Arch* 389:159-170
- Ray S, Maunsell JHR (2010) Differences in gamma frequencies across visual cortex restrict their possible use in computation. *Neuron* 67:885-896
- Rodriguez R, Haberly LB (1989) Analysis of synaptic events in the opossum piriform cortex with improved current source-density techniques. *J Neurophysiol* 61:702-718
- Roelfsema PR, Engel AK, König P, Singer W (1997) Visuomotor integration is associated with zero time-lag synchronization among cortical areas. *Nature* 385:157–161
- Roth LR, Leung LS (1995) Difference in LTP at basal and apical dendrites of CA1 pyramidal neurons in urethane-anesthetized rats. *Brain Res* 694:40–48
- Schomburg EW, Anastassiou CA, Buzsáki G, Koch C (2012) The spiking component of oscillatory extracellular potentials in the rat hippocampus. *J Neurosci* 32:11798-117811
- Schomburg EW, Fernández-Ruiz A, Mizuseki K, Berényi A, Anastassiou CA, Koch C, Buzsáki G (2014) Theta phase segregation of input-specific gamma patterns in entorhinal-hippocampal networks. *Neuron* 84:470-485.
- Schreiber T, Schmitz A (2000) Surrogate time series. *Physica D* 142:646–652
- Shinohara Y, Hosoya A, Hirase H (2013) Experience enhances gamma oscillations and interhemispheric asymmetry in the hippocampus. *Nat Commun* 4:1652
- Shinohara Y, Hosoya A, Yahagi K, Ferecsko AS, Yaguchi K, Sik A, Itakura M, Takahashi M, Hirase H (2012) Hippocampal CA3 and CA2 have distinct lateral innervation patterns to CA1 in rodents. *Eur J Neurosci* 35:702–710

- Sirota A, Montgomery S, Fujisawa S, Isomura Y, Zugaro M, Buzsáki G (2008) Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. *Neuron* 60:683-697
- Somogyi P, Klausberger T (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562:9-26
- Sotero RC, Bortel A, Naaman S, Mocanu VM, Kropf P, Villeneuve MY, Shmuel A (2015) Laminar Distribution of Phase-Amplitude Coupling of Spontaneous Current Sources and Sinks. *Front Neurosci* 9:454
- Steriade M, Amzica F (1996) Intracortical and corticothalamic coherency of fast spontaneous oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2533-2538
- Sullivan D, Csicsvari J, Mizuseki K, Montgomery S, Diba K, Buzsaki G (2011) Relationships between hippocampal sharp waves, ripples and fast gamma oscillation: influence of dentate and entorhinal cortical activity. *J Neurosci* 31:86058616
- Suzuki SS, Smith GK (1987) Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus. I. Behavioral correlates laminar profiles and bilateral synchrony. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 67:348-359
- Suzuki SS, Smith GK (1988) Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus. II. Behavioral correlates laminar profiles and bilateral synchrony. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 69:541-549
- Swanson LW, Sawchenko PE, Cowan WM (1981) Evidence for collateral projections by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus, and the subiculum: a multiple retrograde labelling study in the rat. *J Neurosci* 1:548-559
- Takamura Y, Tamura R, Zhou TL, Kobayashi T, Tran AH, Eifuku S, Ono T (2006) Spatial firing properties of lateral septal neurons. *Hippocampus* 16:635-644
- Trommald M, Jensen V, Andersen P (1995) Analysis of dendritic spines in rat CA1 pyramidal cells intracellularly filled with a fluorescent dye. *J Comp Neurol* 353:260-274
- Tukker JJ, Fuentealba P, Hartwich K, Somogyi P, Klausberger T (2007) Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo. *J Neurosci* 27:8184-8189
- Van Groen T, Wyss JM (1988) Species differences in hippocampal commissural connections: studies in rat, guinea pig, rabbit, and cat. *J Comp Neurol* 267:322-334

- van Harreveld A (1966) Extracellular space in the central nervous system. *Proc K Ned Akad Wet C* 69:17-21
- Vandecasteele M, Varga V, Berényi A, Papp E, Barthó P, Venance L, Freund TF, Buzsáki G (2014) Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:13535-13540
- Varona P, Ibarz JM, López-Aguado L, Herreras O (2000) Macroscopic and subcellular factors shaping CA1 population spikes. *J Neurophysiol* 83:2192–2208
- Vinogradova OS (2001) Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus* 11:578–598
- Wang Y, Toprani S, Tang Y, Vrabec T, Durand DM (2014) Mechanism of highly synchronized bilateral hippocampal activity. *Exp Neurol* 251:101-111
- Willadt S, Nenniger M, Vogt KE (2013) Hippocampal feedforward inhibition focuses excitatory synaptic signals into distinct dendritic compartments. *PLoS One* 8:e80984
- Wu K, Canning KJ, Leung LS (1998) Functional interconnections between CA3 and the dentate gyrus revealed by current source density analysis. *Hippocampus* 8:217-230
- Ylinen A, Bragin A, Nádasdy Z, Jandó G, Szabó I et al. (1995) Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci* 15:30-46
- Zemankovics R, Veres JM, Oren I, Hájos N (2013) Feedforward inhibition underlies the propagation of cholinergically induced gamma oscillations from hippocampal CA3 to CA1. *J Neurosci* 33:12337–12351

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a todo aquel que se lo merece ocuparía demasiadas páginas, pues han sido muchos los que han hecho que haya llegado hasta aquí. Así que prescindiré de hacerlo. Eso sí, no me perdonaría dejar de agradecer a aquellas personas que han contribuido directamente en mi vida académica y científica, que después de todo es lo que nos ocupa. Así que agradezco:

En primer lugar, a Óscar, por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio, y haberme hecho sentir como en mi casa durante cinco años; por haberme formado y transmitido la pasión por la ciencia; por su inestimable ayuda con la maldita burocracia en la recta final. Y por su continuo apoyo

A Julia, por haber estado ahí siempre que lo he necesitado, con una solución bajo la manga a mis innumerables problemas; por haber sido una magnífica compañera investigadora y por haberme dejado sus datos de simulaciones numéricas de los que he hecho uso en la tesis.

A Valeri, por su infinita paciencia, por las múltiples explicaciones y su diligencia a la hora de resolver problemas y por todos los programas de los que he hecho amplio uso a lo largo de mi tesis.

A Nuria y a Ale, por haberme enseñado a moverme en un laboratorio y a que éste también puede ser un lugar en el que pasarlo bien.

A Tania y a Dani, porque, a pesar de haber compartido laboratorio durante tan poco tiempo, han sido unos compañeros geniales. Ambos.

A Pablo Varona, por haber aceptado ser mi tutor cuando aún no era más que un desorientado licenciado.

Muchos años pasé en la Universidad de Sevilla y fue allí, sin duda, donde se terminó de perfilar mi espíritu científico. Así que no quiero dejar de agradecer a Antonio Torres por alentarme a seguir la carrera investigadora y a Miguel Escudero por hacerme ver que toda tarea tiene su importancia. Y a tantos otros profesores: Francisco Cejudo, Gabriel Gutiérrez, Julia Toja...

A pesar de no haberles conocido en persona, también quiero agradecer a mis dos profesores de la UNED, Carlos Fernández y Mar Serrano por su inestimable ayuda y capacidad docente.

Y por último, no podría dejar de agradecerles a Sam y a Max, esos dos amigos que siempre han estado ahí, con quienes aprendí a pensar y a ser inquisitivo, y que me enseñaron a tomarme la vida con extraña filosofía.

¡Ah! Y al Miruvor y a la Aurum.

The Dude abides

APÉNDICE A: ABREVIATURAS

μfEPSP: micro-campos de potenciales postsinápticos excitadores (*micro-field excitatory postsynaptic potential*)

AC/DC: Corriente alterna/corriente continua (*Alternate current/direct current*)

BIC: Bicuculina

CA1/3: Cornus Ammonis 1/3

CC: Correlación cruzada

Comm: Comisural

CSD: Análisis de fuentes de corriente (*Current source density*)

DNQX: 6,7-dinitro-quinolaxina-2,3-diona

E/IPSP: Potencial postsináptico excitador/inhibidor (*Excitatory/inhibitory postsynaptic potential*)

EEG: Electroencefalograma

GABA: Ácido gamma amino butírico

ICA: Análisis de componentes independientes (*Independent component analysis*)

LFP: Potencial de campo local (*Local field potential*)

LS: Septum Lateral (*Lateral Septum*)

NMDA: N-metil-D-aspartato

PLV: Valor del acoplamiento de fase (*Phase locking value*)

Sch: Schaffer

SPW: Sharp wave

VHC: Comisura ventral hipocampal (*Ventral hippocampal commissure*)

APÉNDICE B: PUBLICACIONES

Determining the True Polarity and Amplitude of Synaptic Currents Underlying Gamma Oscillations of Local Field Potentials

Gonzalo Martín-Vázquez¹*, Julia Makarova¹*, Valeri A. Makarov², Oscar Herreras^{1*}

1 Department of Systems Neuroscience, Cajal Institute – Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, **2** Department of Applied Mathematics, Faculty of Mathematics, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Fluctuations in successive waves of oscillatory local field potentials (LFPs) reflect the ongoing processing of neuron populations. However, their amplitude, polarity and synaptic origin are uncertain due to the blending of electric fields produced by multiple converging inputs, and the lack of a baseline in standard AC-coupled recordings. Consequently, the estimation of underlying currents by laminar analysis yields spurious sequences of inward and outward currents. We devised a combined analytical/experimental approach that is suitable to study laminated structures. The approach was essayed on an experimental oscillatory LFP as the Schaffer-CA1 gamma input in anesthetized rats, and it was verified by parallel processing of model LFPs obtained through a realistic CA1 aggregate of compartmental units. This approach requires laminar LFP recordings and the isolation of the oscillatory input from other converging pathways, which was achieved through an independent component analysis. It also allows the spatial and temporal components of pathway-specific LFPs to be separated. While reconstructed Schaffer-specific LFPs still show spurious inward/outward current sequences, these were clearly stratified into distinct subcellular domains. These spatial bands guided the localized delivery of neurotransmitter blockers in experiments. As expected, only Glutamate but not GABA blockers abolished Schaffer LFPs when applied to the active but not passive subcellular domains of pyramidal cells. The known chemical nature of the oscillatory LFP allowed an empirical offset of the temporal component of Schaffer LFPs, such that following reconstruction they yield only sinks or sources at the appropriate sites. In terms of number and polarity, some waves increased and others decreased proportional to the concomitant inputs in native multisynaptic LFPs. Interestingly, the processing also retrieved the initiation time for each wave, which can be used to discriminate afferent from postsynaptic cells in standard spike-phase correlations. The applicability of this approach to other pathways and structures is discussed.

Citation: Martín-Vázquez G, Makarova J, Makarov VA, Herreras O (2013) Determining the True Polarity and Amplitude of Synaptic Currents Underlying Gamma Oscillations of Local Field Potentials. PLoS ONE 8(9): e75499. doi:10.1371/journal.pone.0075499

Editor: Gareth Robert Barnes, University College of London - Institute of Neurology, United Kingdom

Received: June 5, 2013; **Accepted:** August 15, 2013; **Published:** September 20, 2013

Copyright: © 2013 Martín-Vázquez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the grants BFU2010-19192/BFI and FIS2010-20054 from the former Spanish Ministry of Science and Innovation; <http://www.idi.mineco.gob.es/>. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interest exist.

* E-mail: herreras@cajal.csic.es

☯ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Local field potentials (LFPs) are raised by population synaptic currents and typically display irregular behavior interspersed with epochs of prominent oscillatory activity that are concentrated in narrow frequency bands [1]. Computationally, LFP-oscillations can be viewed as temporal windows to precisely control the timing of converging pathways. They may also have a role in the formation of neuron assemblies [2]. Notably, significant fluctuations in the amplitude, duration and spatial localization of successive LFP-waves are observed that reflect the rich internal dynamics of the afferent and target populations [3,4,5,6,7]. In the

monolayered hippocampus, the bulk of currents is generated by a single target population [7,8,9,10], but there may be more in the cortex [11]. Reading amplitude fluctuations in LFP-waves requires an understanding of the number and nature of the synaptic pathway/s from which they originate (i.e., single or multiple, excitatory or inhibitory). Classical ambiguities regarding the localization and synaptic nature of the current sources underlying LFPs impede a straightforward interpretation of these fluctuations [12]. Also, phase relationships between LFP-wave and spike trains, which are widely used in the literature to establish cause-effect relationships rarely allow one to determine whether the firing unit is pre- or postsynaptic to LFPs.

Although the theoretical bases of LFP generation are well established [13,14,15,16,17,18,19], this topic is rarely explored directly due to the significant difficulties in resolving the inverse problem of identifying the neuronal current sources from LFPs with subcellular precision. Indeed, the number of co-activated afferent populations at a given instant is unknown [7]. Moreover, most modern amplifiers reject the DC component of LFPs and as a result, defining the polarity of the AC-coupled LFP-oscillations is precluded by the lack of a baseline, which in turn frustrates the determination of the excitatory or inhibitory nature of the underlying synaptic currents. As a consequence, one cannot set a time reference for the initiation of each LFP-cycle, which is necessary to establish the phase of the ongoing fluctuations.

In laminated brain structures with stratified inputs, such as the cortex and hippocampus, the polarity of underlying transmembrane currents can theoretically be estimated from the spatial gradients of the extracellular field potential [13] through current source-density (CSD) analysis [20,21]. CSD maps are free of volume-conducted currents from remote cell generators. Therefore, this analysis identifies membrane domains that produce a net flow of inward or outward currents (sinks and sources, respectively), which can then be matched to anatomical data to determine whether a given domain is associated with synaptic sites or with passive counterparts. While this approach is valid for customary evoked potentials during exogenous activation of individual major pathways [11,20,22,23,24,25], it cannot be applied to ongoing LFPs. The CSD of oscillatory LFPs always exhibits a temporal succession of sinks and sources in both the active and passive domains [5,26,27,28,29,30,31,32]. This provides no information as to the polarity of the synaptic currents and thus, several distinct interpretations are feasible (Figure 1A). In most cases, either the sources or sinks will be spurious, making it difficult to determine the location and polarity of the currents, and to interpret their fluctuations.

Neither theoretical nor experimental techniques alone provide an acceptable solution to the problem described above. Thus, we devised a combined approach that collects all the necessary information and determines the polarity and reliable magnitude of synaptic currents. Here, the analysis of animal data is presented side by side with computer simulations that model LFP recordings in an architectonically realistic aggregate of the CA1 region of the hippocampus [33,34,35]. The parallel processing of animal and model LFPs helps us to understand the scaling-up from single cell currents to aggregate LFPs, and the biophysical basis of the procedure.

Results

Rationale and strategy

During ongoing oscillations two key issues must be addressed sequentially: (a) mixed activity induced by several afferent populations must be separated to gain accurate spatial limits for each synaptic input; and (b) the baseline reference missing in standard AC-coupled recordings must be estimated to obtain correct polarity of the input. We previously described the successful resolution of problem “a” [8,35] (see steps 2 and

3 in Methods), while the resolution of problem “b” is described below.

Let us first illustrate the issue by employing numerical simulations to solve the forward problem (Figure 1B), i.e. how to evaluate LFPs from synaptic currents in specific domains of the cellular units (see model details in Methods). It should be noted that both excitatory and inhibitory synaptic activation of discrete cell domains (e.g., thick arrows in Figure 1B1) create loops of inward and outward transmembrane currents that span the entire cell anatomy. In the population, these loops appear macroscopically segregated into different strata corresponding to homologous cell domains, termed *active* for the sites of synaptic currents and *passive* for their surrounding domains. Thus, the resulting LFPs in the aggregate *follow the temporal but not the spatial pattern* of synaptic currents. To illustrate this we simulated an excitatory input (Figure 1B1, I_{syn}) to a dendritic band in the apical tree of a model pyramidal neuron (Figure 1B2, red compartments). A population of these neurons generated oscillatory LFPs that displayed positive or negative polarities in different spatial domains (Figure 1B3). Indeed, LFPs may be of opposing polarity at sites equally spaced from the active zone (compare LFPs labeled by arrows). Thus, direct observation of an LFP cannot be used to infer the location and polarity of the synaptic currents. The problem is further complicated for real LFPs recorded in AC-coupled mode (Figure 1A). Filtering removes or severely distorts useful landmarks provided by slow and DC components, and only fast waves (usually > 0.1 Hz) remain in the recording. Therefore, a given LFP oscillation could have been generated by either pure excitatory (Figure 1A, option 1) or inhibitory (option 3) inputs, or by an alternating succession of excitatory and inhibitory inputs (option 2). The difference between LFPs recorded in AC or DC-coupled modes and the estimation of their respective underlying currents by CSD are illustrated in Figure 2 (blocks 1 and 2).

The above uncertainties burden heavily the cellular interpretation of LFPs. The most outstanding ones are illustrated in Figure 1C and 1D. Standard AC-coupled LFPs were recorded simultaneously along a linear track spanning the CA1 field of the rat hippocampus (e.g. Figure 1A). These exhibited bouts of activity of variable duration but with a characteristic laminar distribution. In the CA1, small amplitude gamma oscillations appear in a rather stable manner in the zone where Schaffer collaterals terminate in the st. *radiatum*. However, when these laminar LFPs are analyzed by CSD to estimate the underlying population synaptic currents (Figure 1C), one can appreciate notable divergence in amplitude and even polarity of individual gamma waves recorded in the Schaffer band (trace superimposed in the CSD map) compared to the currents estimated at the same site. Note that some waves had no associated current sink while in others the net current was reversed to a source (compare the waves labeled with triangles). The disparity between the LFP and CSD at a given site was associated with the presence of non-coherent currents in other strata (e.g., the sink at the st. lacunosum-moleculare marked with an arrow in Figure 1C), the intensity and polarity of which affected the net current of individual waves in the location of Schaffer terminals.

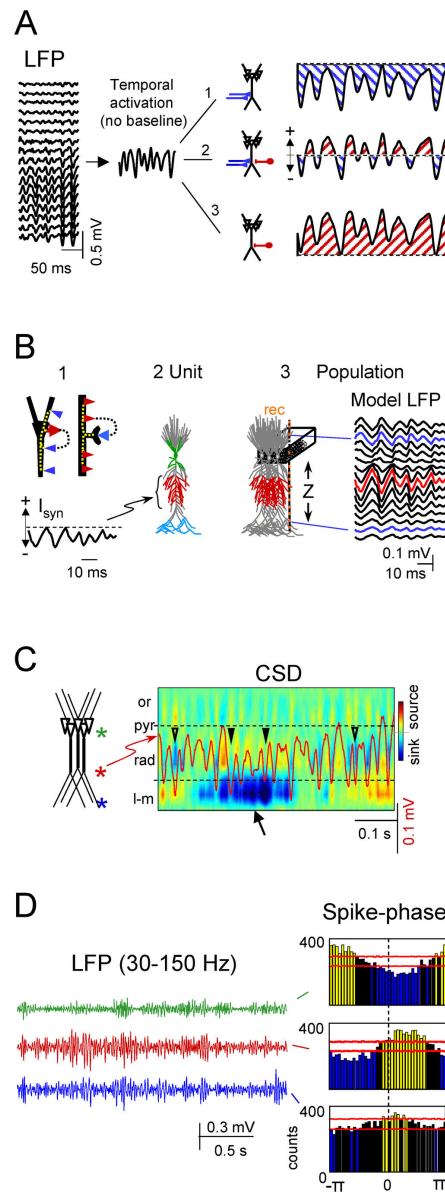


Figure 1. Illustration of the problem and the limitations for the reading of fluctuations in oscillatory LFPs. Linear LFPs recorded in standard AC-coupled mode along the vertical axis of the CA1 hippocampus (A). The epoch displays rhythmic gamma waves with different amplitudes. The oscillatory nature and the removal of slow-components by AC-coupling eliminate the true baseline and impede determining the excitatory (1), inhibitory (3), or dual (2) nature of the underlying currents. B: Single cell-to-aggregate scaling of synaptic currents (forward solution for model LFPs)(1). Whether inhibitory (red arrow in the soma) or excitatory (blue arrow in spine), the synaptic currents set transmembrane loops that contain both inward and outward currents distributed throughout the cell. 2-3 show the scaling of single cell currents to population LFPs using a realistic multineuronal CA1 model. For testing purposes, we used anatomically separated inputs (color coded). In the example, the pyramidal cell (2) was injected with a rhythmic sequence of excitatory synaptic currents (I_{syn}) at a dendritic domain, and the estimated currents in all compartments were fed into the aggregate model (3) from which the LFPs were calculated along the main cell axis (Z). The complex morphology of individual cells led to strong asymmetrical distribution of macroscopic LFPs (arrows). C shows an LFP trace recorded at the st. *radiatum* (in red) superimposed to the spatiotemporal map of CSD. Note the variable and poor matching of currents and gamma waves (arrowheads) in the synaptic Schaffer domain (between the dashed lines), caused by a variable offset due to the strong currents in other domains (arrow). Or, stratum oriens; pyr, pyramidal; rad., *radiatum*; l-m, lacunosum-molecular. D shows different spike-phase histograms for a single spike train from a unit recorded in the CA1 and LFPs simultaneously recorded at three different sites (marked by asterisks in c). Horizontal red lines mark the confidence limits: only the yellow and blue bars are statistically significant.

doi: 10.1371/journal.pone.0075499.g001

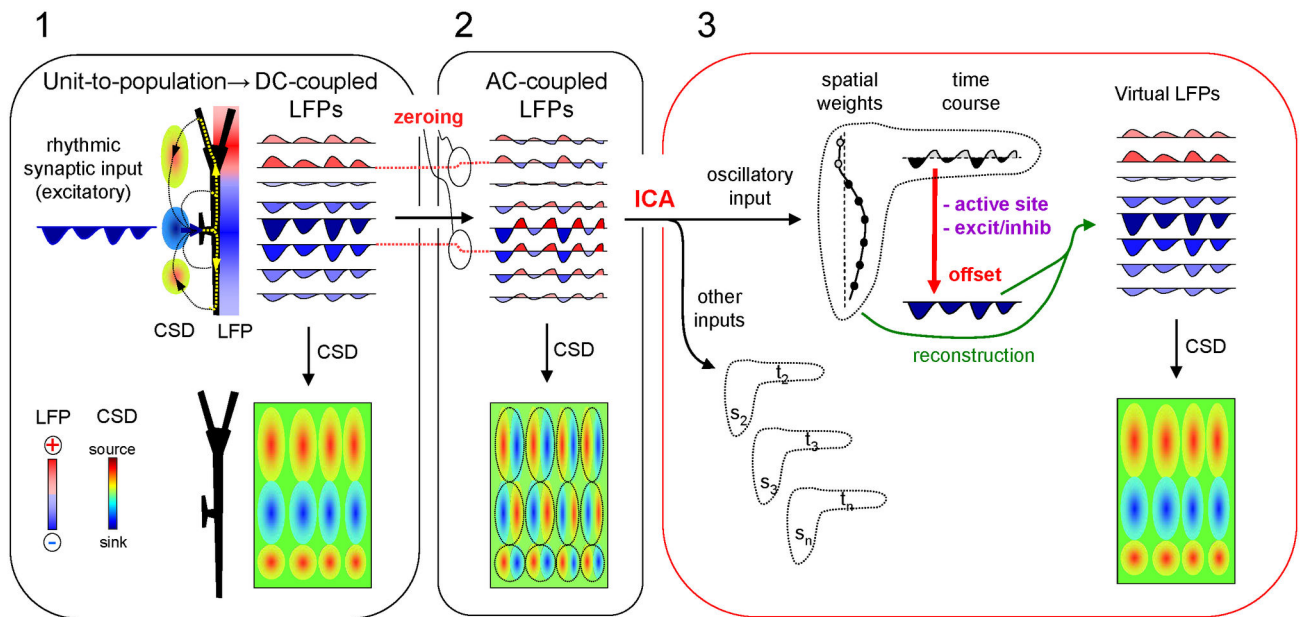


Figure 2. Summary of the procedure and signal transformations. Block 1 illustrates the relationship between the single cell currents and the macroscopic field potentials recorded in ideal DC-coupled mode. A rhythmic excitatory drive into a discrete dendritic domain establishes local sinks of current, surrounded by sources (CSD). These spatially-aligned sources and sinks produce laminar field potentials of uneven strength and polarity, whose CSD analysis renders a correct estimation of sources and sinks amplitudes and locations. Block 2 illustrates the effect of AC-coupling on recordings. Note that channels are individually filtered (*zeroing*) and thus each is offset by a different amount (red dotted lines). Consequently, each gamma wave is transformed into a biphasic sequence at any location. CSD analysis of the AC-coupled profile results in spurious sequences of sources and sinks at all sites. Each LFP wave (dashed ovals) returns a source/sink pair, while the lack of a true reference baseline confounds their initiation time and does not allow us to ascertain which of sources or sinks are expected in cell domains. Block 3 illustrates the rectification procedure. First the ICA decomposes the original signals into pathway-specific generators (pairs s_i, t_i , s_n, t_n ; only one is used for simplification), each with a spatial distribution and a temporal activation (time course). Note that the curve of spatial distribution is proportional to the collection of offsets introduced by AC-coupling (*zeroing* in Block 2), whilst the time evolution is unique. The experimental determination of the active synaptic sites and the excitatory/inhibitory chemical nature allows offsetting the time envelope as required in order to achieve homogeneous polarity (red vertical arrow). The subsequent reconstruction using the rectified time envelope (green curved arrows) regenerates LFPs with the correct baseline at each recording site. Consequently, the application of CSD analysis generates spatiotemporal maps of sources and sinks in which individual waves have the correct amplitude and duration.

doi: 10.1371/journal.pone.0075499.g002

Such discrepancy not only prevents a quantitative evaluation of ongoing LFP waves in terms of compounded output of an afferent population, but also reduces the possibilities of identifying the population by correlation with firing of units. Indeed, the temporal relation of the spike trains from single units to LFPs simultaneously recorded in different strata revealed different phase relations (Figure 1D). In consequence, the position of the unit relative to the LFPs (pre- or postsynaptic) cannot be safely determined.

We propose a series of signal transformations to recover the lost/hidden information (Figure 2). Blocks 1 and 2 illustrate the scaling of single cell currents to macroscopic field potentials and the distortion introduced by recording in AC-coupled mode, respectively (note the different amount of DC potential removed at different sites within the same profile). Our approach consists of five steps:

1. Simultaneous recording of LFP profiles along the main axis of CA1 pyramidal cells (Figure 2, block 2).
2. Separation of pathway-specific contributions (*problem a*) for which we use a combination of previously described mathematical treatments of LFPs including Independent Component Analysis (ICA) [8,35,36] (transition between blocks 2 and 3: see Methods).
3. Estimation of the dendritic domains of transmembrane currents set by the oscillatory input of interest using CSD analysis of its reconstructed (virtual) LFPs.
4. Identification of active (synaptic) domains and their excitatory/inhibitory nature using local microinjection of transmitter blockers at each of the dendritic domains.
5. Rectification of CSD maps by offsetting according to the polarity of the active currents. The steps 3 to 5 are represented by the red vertical arrow in block 3 of Figure 2.

For the purpose of illustration, we selected the ongoing Schaffer input to the CA1, *ignoring a priori knowledge of its excitatory nature*. In anesthetized animals the Schaffer input constitutes a steady sequence of discrete field events within the gamma frequency [6,37]. We also applied the procedure to model LFPs and compared the statistical parameters with the experimental data side by side.

The CSD of pathway-specific LFPs exhibits stable spatial domains (steps 2 & 3)

Although the activation of a single pathway should yield a stratified distribution of sources and sinks in specific cell domains [37], this is not normally evident during ongoing activity contributed by multiple pathways (Figure 3A). The data from the model confirmed that the blurring of expected subcellular domains of current sources and sinks arises due to the overlapping temporal activation of multiple synaptic inputs arriving at different dendritic loci of the pyramidal cells (Figure 3A, right column).

To identify pathway-specific contributions to the LFPs (Step 2) we applied the ICA (see Methods) to long epochs of linear recordings. Consistent with our previous findings [7,36], three different components or LFP-generators were obtained in the CA1 region (Figure 3B). We selected the CA3-CA1 Schaffer input (G2) due to its stable development of gamma oscillations of notable amplitude fluctuation in the anesthetized animal [6]. The gamma waves in the Schaffer-generator are produced by postsynaptic currents elicited in the CA1 pyramidal population by the synchronous firing of upstream CA3 pyramidal cell clusters, thus termed micro-field EPSPs (μ -fEPSPs) [6]. For clarity, we simulated in the model a much more regular gamma oscillation and used a sharper spatial distribution of the input (Figure 3B).

We next reconstructed virtual Schaffer-specific LFPs (see Methods), which contained part of the raw LFPs if the corresponding pathway alone was active. In contrast to the raw LFPs, the pathway-specific LFPs displayed full laminar coherence and their amplitudes were proportional at any given time instant. The CSD (Step 3) revealed two significant properties (Figure 3B, lower panels): 1) mixed current sinks and sources; and 2) clear stratification over the pyramidal cell axis in both experimental and model data (dashed lines in CSDs). The first property can be explained by the unknown (filtered out) baseline, while the second one was confirmed to reflect natural boundaries of active and passive dendritic domains in the model. The emergence of cellular domains for Schaffer-associated currents indicated that the temporal variation in the spatial shifts introduced by concomitant inputs had been corrected, but we had yet to define active and passive domains, and determine the correct polarity.

Chemical identification of the active synaptic domain (step 4)

The identification of the active domains and the excitatory/inhibitory nature of the synaptic currents were based on the assumption that only one type of blocker should exert an effect when applied at the active domain, i.e., the sites at which postsynaptic receptors are located. Thus, we injected DNQX or

bicuculin (BIC) to block either Glutamate or GABA receptors, respectively, at the cell domains identified in step 3. Examples with blockers injected into the st. pyramidale/oriens and into the center of the middle band (st. *radiatum*) are shown in Figure 4A for the same animal. DNQX had no effect when applied to the st. pyramidale/oriens (Figure 4A, Expt. 1) and likewise, BIC did not alter the power of the Schaffer-specific LFPs at any location (Experiments 3 and 4). Only DNQX suppressed the oscillations when applied to the center of the middle apical dendritic band (Expt. 2). Based on these findings we conclude that the middle apical dendritic domain (blindly determined by the CSD of virtual LFPs) is active and receives excitatory input, as supported by the results from other animals (75% reduction for DNQX in st. *radiatum*, $n = 3$ animals; Student's t -test, $p < 0.001$; Figure 4B).

Rectification of synaptic currents (step 5)

According to the field theory, extracellular currents at a synaptic site exhibit a unique polarity regardless of the temporal activation, while those in surrounding cell domains must be of the opposite polarity (return currents). As we demonstrated that the input was excitatory in step 4, the net CSD for this LFP-generator in the active band must be negative at any time instant, i.e., we should have only sinks (inward currents) in the synaptic domain and not sources (outward currents). Thus, we rectified the time course of the Schaffer LFP-generator (G2 in Figure 3A3 and 3B3) by applying an offset to the temporal envelope in order to maintain its negative polarity (Figure 5A). In other cell domains, the amount and sign of the offset removed by AC filtering of native LFPs may differ since it may have been contributed by different pathways. Importantly, the offsets corresponding to a single pathway in different recording sites must be proportional at any instant and jointly reproduce the same spatial distribution of the AC-coupled pathway-specific Schaffer LFPs (Figure 3B). Therefore, reconstruction of virtual LFPs using the corrected time course and the spatial distribution of the visible (AC-coupled) part of the Schaffer generator introduces the necessary offset in each channel; sinks only appear in the synaptic band and sources in the surrounding domains (compare lower panels in Figure 3B with Figure 5B, before and after rectification, respectively). Moreover, we noticed that the sequential appearance of sinks and sources no longer occurred. Accordingly, negative-going LFP-waves were matched with pure sinks in the synaptic domain and they maintained parallel time-courses, as expected. Although the absolute value of individual LFP-waves is unreliable in raw potentials, the rectified CSD provides a correct estimation of the magnitude of the activation of the corresponding synaptic pathway.

Determining the true value and polarity of ongoing gamma waves

From the rectified currents in the synaptic domain we were able to quantify the error while estimating the CSD from raw LFPs. When the distribution of the amplitudes of synaptic events (μ -fEPSPs) in the Schaffer band (upper histograms) and the combined amplitude/duration distributions (lower

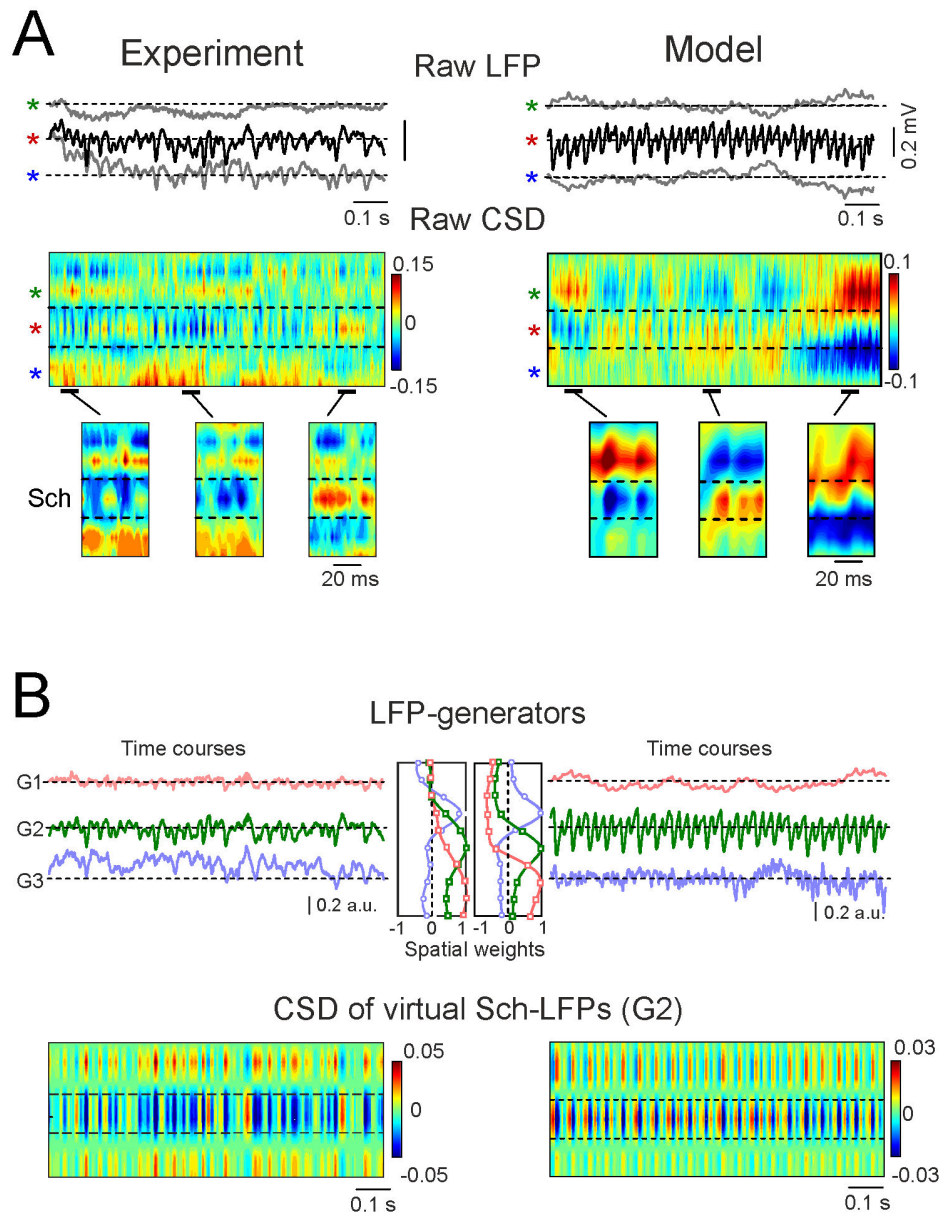


Figure 3. Isolation of currents containing contributions from an oscillatory LFP of interest. Application of the procedure to experimental and model LFPs are presented side by side to facilitate the biophysical interpretation of signal transformations (left and right columns, respectively). A shows sample traces of raw LFPs at different domains along the pyramidal cell axis: colored stars mark recordings in the st. pyr, rad. and l-m, respectively. Model LFPs were high-pass filtered (>0.1 Hz) to reproduce AC-coupling of experimental recordings, and the distribution of the inputs was simpler than in the real CA1 to better visualize the changes in oscillatory input. CSD analysis of LFPs produced a complex spatiotemporal mixture of current sinks and sources. Few or no domains of active synaptic sites (cf. Figure 1) were detected. The amplified segments below show that individual gamma waves in the st. rad. may be matched by either sources or sinks at the active Schaffer domain. B shows the separation of the pathway-specific contributions by ICA applied to raw LFP profiles. Three different generators (G1-G3) were obtained, each of which defined by the characteristic spatial distribution (weight at each electrode) and temporal activation specific to the period analyzed. The respective spatial distributions are shown in the middle. Those obtained for model LFPs tightly reproduced the distribution of synaptically activated compartments, and the temporal sequence of inputs was accurate. Following reconstruction of pathway-specific LFP profiles, the application of CSD analysis rendered a spatiotemporal map of sources and sinks in which stable reversal sites were observed. The model confirmed that these corresponded to the macroscopic boundaries of active and passive domains of the synaptic input. However, note that both sinks and sources still appeared at the synaptic site. These temporal patterns do not allow us to determine whether sinks or sources at each domain are real or spurious.

doi: 10.1371/journal.pone.0075499.g003

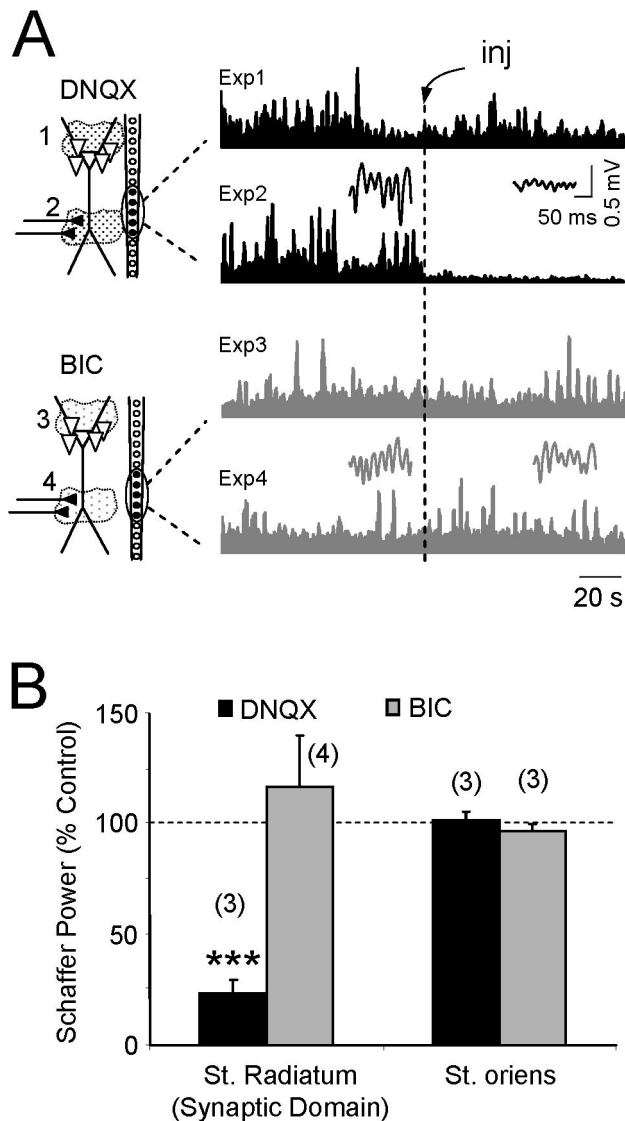


Figure 4. Experimental localization of the active synaptic domain and determination of its chemical nature. Excitatory and inhibitory neurotransmitter blockers were injected locally, one at a time, near the linear probe at the sites located in the spatial domains found after CSD analysis of virtual Schaffer LFPs (A). DNQX and bicuculline (BIC) were injected in the st. pyr./st. or (Experiments 1 and 3). or the st. rad. (Experiments 2 and 4). The plots illustrate the temporal envelopes of the activity of the Schaffer generator obtained following ICA of the LFP profiles before and after drug injection (inj). The insets show sample epochs of virtual Schaffer LFPs. Note that only the Glu-receptor blocker DNQX abolished the activity of this generator when applied in the st. rad. (Expt. 2). All experiments belong to the same animal. B shows the population data (mean \pm s.e.m.; n is the number of animals): *** $p < 0.001$, Student's t -test.

doi: 10.1371/journal.pone.0075499.g004

densitograms) were plotted (Figure 5C1), the events had positive (sources) or negative (sinks) polarity as they were measured from baseline. The epoch analyzed yielded distribution that peaked at 0.1 mV in amplitude and 13 ms in duration. After rectification all the waves of the CSD became pure sinks (negative), and both the mean amplitude and duration increased to -0.4 mV and 15 ms, respectively (Figure 5C2). Notably, identical results were obtained in numerical simulations. It should be noted that the entire process corrected individual waves by different amounts, as each had been offset variably according to the concomitant inputs.

Reliable classification of pre and postsynaptic units by spike-phase correlations

The rectification procedure described above enables the zero reference (beginning) to be defined for each gamma wave in the time course of the afferent input. We built spike-phase correlations of the phase of gamma waves (with and without correction) in the st. *radiatum* of the (postsynaptic) CA1 region and the spike trains of pyramidal cells in the ipsilateral afferent CA3 region (Figure 6A), as well as with cells found in the CA1 itself. Globally, the phase-spike correlation significantly depended on whether we used raw (Figure 5B, left) or Schaffer-specific LFPs (right), yet more importantly, we observed a prominent site-dependent character of the phase-spike histograms.

CA3 cells (28 of 29 identified as pyramidal neurons; 15 min epochs; $n = 11$ animals) showed a significant spike triggered average (STA) for the raw LFP in the postsynaptic Schaffer band (Figure 6B1), indicating a significant association of the LFP in CA1 to spikes generated by these cells [6]. We observed a significant phase-correlation of these cells with raw LFPs in the st. *radiatum* (Figure 6B1, orange bars in blue-boxed histogram, $7.6 \pm 3.1^\circ$, mean \pm s.e.m.). However, this correlation disappeared at sites of return currents that were influenced by other inputs (Figure 6B1, green-boxed histogram, st. *pyramide/oriens*). Evaluating the phase-spike histograms over virtual Schaffer-LFPs returned correct correlations. Besides the phase coupling near 0° in the synaptic band ($3.9 \pm 3.2^\circ$; blue-boxed histogram), we also observed significant coupling at 180° ($191 \pm 3.2^\circ$; green-boxed histogram, red arrows) that corresponded to phase-shifted return currents, as predicted by the field theory (Figure 6B1, note phases of green and blue traces). These experimental correlations were supported by the numerical simulations (Figure 6B2). The slight deviation of the phase in simulated relative to the experimental results is due to the absence of natural synaptic delays and the temporal jitter of individual spikes in the model.

No relationship with the Schaffer gamma waves (i.e., postsynaptic to Schaffer-LFPs) was evident for the majority of putative interneurons recorded along the CA1 region, as clearly shown in four representative examples of the phase-spike correlations (e.g. cell 1 in Figure 6C). We found only 9 out of 24 cells with significant STAs and phase coupling to virtual Schaffer LFPs, yet with a relatively large dispersion within the gamma cycle (e.g., cells 2-4). While zero-phase coupling (with slight positive delay due to spike conduction) is expected for afferent CA3 pyramidal cells, the phase dispersion of CA1 units

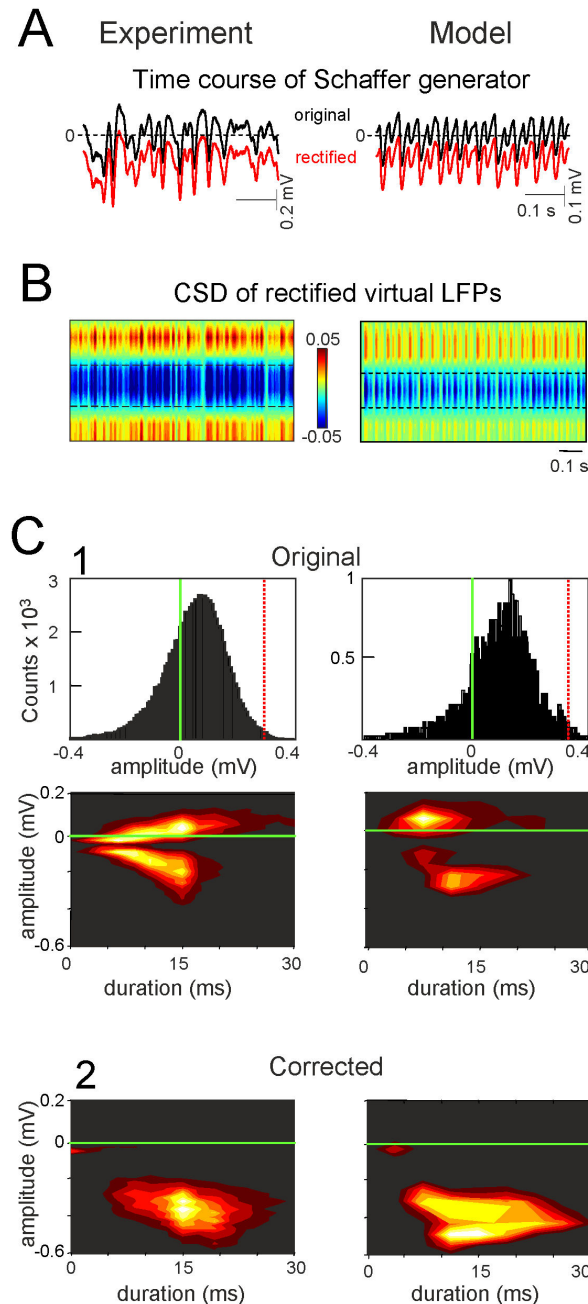
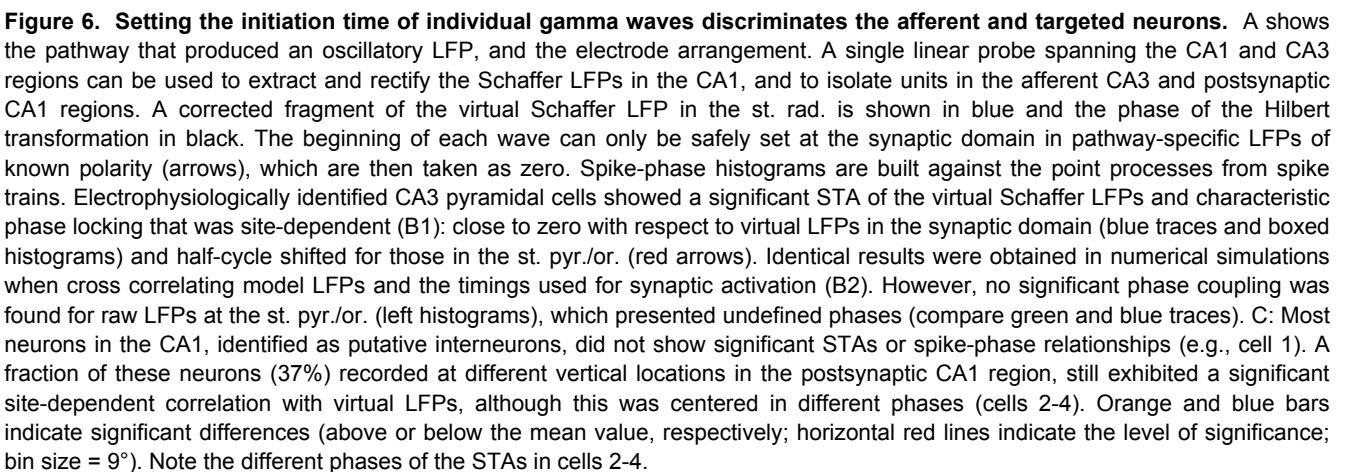


Figure 5. Baseline rectification of the temporal envelope leads to clean CSD bands in virtual LFPs. The temporal activation of the epochs analyzed was rectified by a constant amount and polarity, as determined experimentally (A). This process enabled the lost DC components to be restored at each recording site by subsequently reconstructing virtual LFPs. Since the corrected LFPs are proportional to the underlying current sinks, either one can be used for quantitative estimation of the individual wave parameters. CSD analysis of rectified virtual LFPs in the experiment and the model (B) renders clean bands of sinks at the synaptic domain of the Schaffer input and surrounding sources in the st. pyr and I-m (the epoch corresponds to the same segments as in Figure 3). C shows the estimation of the amplitude and duration of individual gamma waves before (1) and after (2) correction in long experimental (600 s) and model epochs (450 s). The distribution of amplitudes in raw experimental and model LFPs revealed absolute positive and negative values for the individual waves due to the ongoing offset in raw LFPs, which turned their absolute values to biphasic or pure positive values. Following correction, both the absolute amplitude became solely negative and they increased. The densitograms below show the distribution of the amplitude/duration pairs accumulated from individual waves in representative experiments and simulations. Note that after correction, the cloud is not a simple transposition in the two axes, as individual dots (waves) may have required different degrees of correction.

doi: 10.1371/journal.pone.0075499.g005



PLOS ONE | www.plosone.org

indicates the mono- or polysynaptic drive of these units by the Schaffer input.

Discussion

The use of LFPs to reflect neural activity requires two main obstacles to be overcome: the AC-coupling of recordings and the temporal variation when blending electrical fields produced by co-activated synaptic inputs. We show that by combining the segregation of pathway-specific contributions to LFPs with local pharmacology we can localize synaptic domains to the cell generators and determine the polarity of synaptic currents. This information allows us to rectify temporal fluctuations in the oscillatory component of the baseline, and to recover the correct polarity and magnitude of membrane currents at any given time point or location. As a result, amplitude fluctuations of successive waves can be interpreted as the natural variations in afferent activity in homogeneous upstream excitatory or inhibitory populations. This approach also allows us to identify the beginning of each wave, which facilitates their matching to spike trains. Accordingly, the afferent cells of origin exhibit a significant phase relationship at fixed positive values while postsynaptic units activated by the input show varying phases according to mono or polysynaptic delays.

An essential step in the procedure is to determine the site and chemical nature of the active synapses in experiments, such as in the excitatory Schaffer pathway studied here. Although the procedure can be generalized to other pathways and LFPs, each may require ad hoc modifications and/or further testing in complementary experiments. For instance, one may anticipate some complications for inhibitory-based oscillatory LFPs. Thus, the use of GABA blockers typically initiates epileptic activity that may profoundly alter network activity and hence, the synaptic composition of LFPs [7]. Nevertheless, this step is formally qualitative, that is the procedure does not require the analysis of LFPs after transmitter blockade but it is only used to find out whether it is effective in reducing the oscillatory LFP of interest in a specific subcellular domain, given that the offset for baseline correction is determined empirically on the crude temporal envelope of the ICA-isolated oscillatory component. It may happen that a given oscillatory LFP is blocked by both Glu and GABA antagonism in the same or different subcellular domains, such as would occur by the blockade of an excitatory drive to a population of interneurons ultimately producing the inhibitory LFP oscillation [32]. In such cases it is crucial to ensure that only one pathway is contributing to the currents underlying the LFPs and thus, mathematical separation becomes more critical. Normally, the excitatory drive to multipolar interneurons does not produce any significant LFP. Anatomical data precisely describing the different territories of interneuron dendrites, and of their axonal contacts onto principal cells, may help guide pharmacological intervention. There may also be cases in which two afferent pathways overlap so tightly on the same subcellular domain of target populations that their separation by ICA methods is unfeasible (e.g., the mixture currents in the CA1 st. lacunosum-moleculare [7]). In this situation, the present approach will not be efficient as it

requires full pathway-specificity. Still, it may help to know if only one or both afferent populations send an oscillatory patterned output, as the present approach could be further complemented with additional techniques for separation, such as temporal ICA or Fourier-based methods.

Realistic modeling of LFPs helps to understand the scaling of single-cell currents to macroscopic fields in volumes within a common biophysical framework [33,34]. Here we use these realistic models to allow compartmental currents interact freely in function of the channel kinetics and the morphoelectronic structure of the cellular units, thereby showing that the mathematical treatment of compound signals is not a statistical construct but rather, that it truly derives from the electrochemical nature of the signals, and their interplay in cell and volume conductors. We previously verified that within plausible physiological ranges of unitary settings, LFP reproduction from subthreshold synaptic inputs is consistent [35]. However, substantial differences can be expected through sustained regional changes in membrane conductance, such as those produced by synaptic bombardment in afferent pathways missing from the model. However, for the present purposes the most relevant setting is the architecture of the population, which makes it only applicable to LFPs in the CA1 region. A truthful cytoarchitecture is essential, since cell geometry and the population curvatures can severely distort LFPs [14,17,19] to the extent that they may reach a larger amplitude even far from the generating cell elements, such as in the hilus of the Dentate Gyrus [38]. In curved structures, a careful CSD is crucial to finely discriminate active from passive somatodendritic domains.

The variety of spatiotemporal combinations brought about by the activation of different pathways that contribute to field oscillations and LFPs in general is not amenable to approaches based on frequency decomposition alone [12,39], given that frequency domain methods cannot detect the shifting activation/deactivation of multiple current generators. Indeed, the variability and inconsistency of the frequency bands recorded in the same or different cortical area(s) suggest that this problem may be more widespread than generally suspected [40,41]. It is also common to build depth profiles of the waves averaged against an arbitrarily chosen phase [42]. However, this approach does not capture the dynamic information contained in wave fluctuations. Other procedures seek the partialization of recordings relative to a distant point (partial coherence analysis) [43,44], which allows a degree of spatial and temporal segregation of activity [9], but does not solve the problems related to polarity of the underlying synaptic currents. One might also think that estimating the CSD of ongoing LFPs would be sufficient to discriminate both the polarity and the contribution of multiple pathways. Indeed, CSD analysis does remove volume-conducted currents, although it cannot separate the mixed currents elicited by multiple generators within the recording zone. Active and passive sinks and sources elicited by pathways converging on pyramidal cells exert an envelope effect on one other [6,7] to the extent that they become unrecognizable in some epochs, thus polarity is unreliable. Although several approaches have been proposed to identify stable spatial domains (e.g., applying ICA

to spatiotemporal maps of CSD), these methods are not very efficient when dealing with physiological data [45].

AC-coupling of standard amplifiers introduces spatial bias by subtracting the mean value from each recording (cf. in Figure 2). ICA of LFPs efficiently cleans concomitant inputs and renders pathway-specific components in which the AC-coupling-related bias remains. We have shown that the AC-bias can be easily corrected for each LFP-generator separately. The key step is the spatial and temporal dissociation of LFP generators extracted by ICA. Thus, by introducing an offset on the temporal component only, the subsequent reconstruction enters a weighed offset in each recording site such that cell domains achieve homogeneous current polarity. Although the DC component cannot be restored precisely, the rectified currents fulfill the criteria for the spatial distribution of sub-threshold synaptic currents elicited by neuronal generators: (1) the instantaneous balance of sources and sinks (net generator current equals zero); (2) a unique macroscopic polarity of currents specific for each of the active and passive domains over time. Therefore, the currents underlying each wave gain reliable proportional amplitude over time. The most plausible interpretation of LFPs relates the amplitude of any wave with the number and degree of synchronization of the afferent units that fired together in the upstream population [7,16]. We previously showed that each gamma wave in the Schaffer LFP-generator represents excitatory input from a different afferent cluster of CA3 pyramidal cells, and that the CA1 pyramidal cells fired more frequently when time-locked to the larger waves [6]. Accordingly, wave fluctuations appear to reflect the size of the successive cell clusters.

Our procedure to rectify the time envelopes of LFP-generators enables the initiation of each wave to be defined with reasonable precision. This cannot be performed for raw LFPs, for which arbitrary phases are routinely employed. Our approach permits the dynamic interactions between afferent and postsynaptic populations to be explored [6,7,37], allowing phase-spike correlations to then be used to discriminate afferent from driven cells. Afferent units maintain a near zero phase with the postsynaptic currents (as in the model or the corrected CSD at the synaptic domain), whereas cells driven by them should exhibit shifted phase coupling according to the EPSP-to-spike lag.

The study of LFP oscillations is largely focused in understanding the cellular and network mechanisms setting and/or contributing to the global pace or to the phase of individual waves in relation to neuron firing [46], while less attention has been paid to the temporal coding inherent to wave fluctuations themselves. The present approach opens the possibility of correcting for some technical drawbacks that have made unreliable such enterprise. Although it is optimized for LFPs obtained in cytoarchitecturally ordered aggregates such as the hippocampal CA1, the essentially blind nature of all steps makes it applicable to other LFP oscillations and structures. Even if the extraction of the pathway-specific components may require ad hoc treatment of signals, the corrected time course is free of spatial constraints and the internal fluctuations can be safely associated to instant

variations in the level of activity of upstream neurons of origin. In future work, this may be tested by exploring in excitatory LFP oscillations the efficiency of waves of different amplitude to fire target neurons. Another interesting perspective is the use of corrected pathway-specific LFP waves in two or more converging inputs to explore how the output code in single cells is elaborated from discrete parallel inputs to dendritic sites not normally accessible to intracellular recordings, and it can be made even in awoken animals.

Materials and Methods

1. Ethics

All experiments were performed in accordance with European Union guidelines (86/609/EU) and Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) regarding the use of laboratory animals, and the experimental protocols were approved by the Research Committee of the Cajal Institute (Permit BFU2010-19192).

2. Experimental procedures

Adult female Sprague-Dawley rats were anesthetized with urethane (1.2 g/kg i.p.) and placed in a stereotaxic device. Surgical and stereotaxic procedures were performed as described previously [47,48]. Concentric stimulating electrodes were placed in the CA3 region ipsilateral to recording to activate Schaffer collaterals in the CA1 field. Multisite silicon probes (Neuronexus, Ann Arbor, MI) of 16 linear recording sites were used to record at 50 μ m steps parallel to the main axis of the CA1 pyramidal cells (AP, 4.5-6.5; L, 2.6-3.5 mm). Linear probes were soaked in 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) before insertion (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) to assess their placement in histological sections post-mortem. A silver chloride wire implanted in the skin of the neck served as a reference for recordings. Signals were amplified and acquired using MultiChannel System (Reutlingen, Germany), and Axon (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) hardware and software (20-50 kHz sampling rate).

The excitatory/inhibitory chemical nature of LFP generators was studied by local application of neurotransmitter blockers via glass recording pipettes (7-10 μ m at the tip). These were introduced at a 10° angle from the vertical axis and targeted loci within 300-500 μ m of the linear probe at different strata of the CA1. Microdrops (50-100 μ l) were adjusted to limit drug effects to within 500 μ m, as determined by the selective modulation of evoked potentials in the desired group of recording sites. Bicuculline methiodide (BIC) (Sigma, St. Louis, MO) or 6,7-dinitro-quinoline-2,3-dione (DNQX; Tocris, Bristol, UK) were loaded into the pipettes to block GABA-A and non-NMDA Glu receptors, respectively. Drugs were dissolved in ACSF at concentrations ~50 times higher than those usually employed *in vitro*. A single injection ensured stable effects of the drug for at least 60 s.

At the end of each experiment the animals were perfused through the abdominal aorta with PBS containing heparin (0.1%) followed by paraformaldehyde (4%), and the animal's brains were processed for microscopic inspection (sections

were stained with either toluidine blue or cresyl violet and examined by fluorescence microscopy).

3. Isolation of ongoing activity from a single pathway (steps 2 and 3)

The ICA provides spatially stable components of coherent activity. While the ascription of ICA components to their source populations and pathways is a challenging problem when recording from a distance, the in-source recording of intra-hippocampal LFPs allows the thorough spatial inspection of active neurons down to the subcellular definition, and direct matching to anatomy as well as to customary spatial profiles of evoked potentials [36].

3.1 Independent component and current source density analyses of LFPs. Detailed procedures have been described previously [6,8]. Mathematical validation and interpretation of ICA components in laminated structures were also performed using realistic LFP modeling [35]. Briefly, M simultaneously recorded LFP signals are represented as the weighted sum of the activities of N neuronal sources or LFP generators:

$$u_m(t) = \sum_{n=1}^N V_{mn} s_n(t), \quad m = 1, 2, \dots, M \quad (1)$$

where $\{V_{mn}\}$ is the mixing matrix composed of the so-called voltage loadings or spatial distributions of all LFP-generators and $s_n(t)$ is the time course of the n -th LFP-generator. As the location of recording sites is known, the joint curve of spatial weights of an LFP-generator equals to instant depth profiles of proportional voltage amongst sites, as during laminar recording of standard pathway-specific evoked potentials. To perform the ICA we employed the KDICA algorithm [49], which returns the activations $\{s_n(t)\}$ and spatial weights $\{V_{mn}\}$ of up to M LFP-generators. Once extracted, each LFP-generator can be analyzed independently by re-constructing its virtual LFPs, $u_j(t) = \sum V_j s_j(t)$. An important preprocessing step is the use of the principal component analysis (PCA), which allows reducing the presence of highly variable remote generators [35] and stabilizes the convergence of the ICA to true stable LFP-generators [8,44]. In this study we used automatic PCA reduction maintaining 99.0% of the initial LFP variance.

The CSD analysis [20,21] determines the magnitude and location of the net transmembrane current generated by neuronal elements within a small region of tissue. We used a one-dimensional approach, which calculates the CSD from the voltage gradients along the cell's axis [23]. Conveniently, the spatial distortion introduced by unbalanced tangential currents is effectively cancelled out by time averaging of the myriads of microscopic currents as if they all were synchronously activated [35]. The curve of spatial weights for each LFP generator is thus, accurate to the subcellular level. Here we assumed that the extracellular space is homogeneous, as the heterogeneity of tissue resistivity at the level of the stratum (st.) pyramidale [50] introduces negligible distortion to the depth profiles when active currents are located in distant dendritic loci. Thus, we assumed a homogeneous resistivity and used arbitrary units for the CSD. For *in source* recordings, the ICA acts as a rejection device for volume-conducted currents [8], although these may appear in other ICA components.

Consequently, the second-spatial derivative of the curve of spatial weights of LFP components extracted for ongoing activity matches that of the CSD, which is verified for excitatory pathways using the corresponding evoked potentials [36].

3.2 Identification of synaptic events. The baseline activity of the Schaffer generator is composed of rhythmic excitatory packages of synaptic events or micro-field excitatory postsynaptic potentials (μ -fEPSPs) in the gamma frequency. To retrieve these events we used the Wavelet Transform of the time course of the Schaffer generator $s(t)$ [6,51]:

$$W(a,b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int s(t) \Psi\left(\frac{t-b}{a}\right) dt \quad (2)$$

Where Ψ is the Haar mother wavelet (well suited to the detection of short pulses in a signal), a is the time scale and b is the localization in time. We then rectified the wavelet coefficients using the following equation:

$$C(a,b) = \max(-W(a,b), 0) \quad (3)$$

The 2D surface obtained describes the local linear fit of the Schaffer-specific LFP by the pulse-like function (Haar) at scale a and localization b . Large absolute values of $C(a, b)$ at a given time instant and scale correspond to abrupt pulse-like transitions in $s(t)$. We can therefore associate these points in the (b, a) -plane with singular LFP events. Consequently, the local maxima

$$(a,b)_k = \underset{w_k}{\operatorname{argmax}} (C(a,b)) \quad (4)$$

define the time instants of μ -fEPSPs (given by $t_k = b_k - ak/2$), their duration (given by a_k) and their amplitude (given by $A_k = C(a_k, b_k)$).

4. Spike sorting, unit classification and statistical tests

Spike trains of individual units were obtained from unfiltered recordings of the CA1 and CA3 regions using wavelet-enhanced spike sorting [52] and local CSD methods. As described previously [6,7,37], units were classified into two subclasses, pyramidal cells and putative interneurons, based on the location of the recording site and additional standard electrophysiological criteria [53].

Spike-triggered averages (STAs) of CA1 LFPs were obtained from a spike series of single CA3 units and for putative interneurons in the CA1 region. Trains contained at least 1,500 spikes and the level of significance was determined using the surrogate test (1,000 trains with randomly shuffled inter-event intervals: $\alpha \leq 0.05$). The standard Student's t -test was used to analyze the differences between two sample means.

To estimate the correlation of unit firings with the phase of LFP-generators, raw LFPs and reconstructed pathway-specific LFPs, we used the phase provided by the Hilbert transform and constructed a histogram of the phase values corresponding to spike occurrences. The Rayleigh test ($p < 0.05$) for non-uniformity of circular data was used to examine the significance of the unit-source couplings.

5. Simulation of ongoing LFPs

Realistic LFPs were simulated as described previously [33,34,35,54]. Briefly, we built a mathematical framework containing the following four coupled components: the spiking activity of afferent populations; the detailed dynamics of single target cells; the architecture of the neuronal aggregate; and the spreading of electrical currents in the extracellular space (Figure 1B).

5.1 Simulation of synaptic inputs. For the sake of completeness we simulated LFPs composed of contributions from multiple synaptic sources in different cell domains in order to perform identical analyses of real and model LFPs, including the extraction of a rhythmic synaptic input from a mixture of complex source composition. In a previous study we demonstrated that inputs contributing a weak variance to the LFP (weak LFP-generators) may suffer from cross-contamination by stronger inputs due to non-linear intracellular interactions of coincident conductances [35]. Thus, we designed a combination of inputs in which our pathway of interest generated a relative variance over the entire set of recordings similar to that found in the experimental results (3-10%) [6,36].

The model LFPs shown here were obtained using a combination of three synaptic inputs in discrete dendritic bands mimicking the stratified input from populations afferent to principal pyramidal cells of the CA1 (colored compartments in the schematic neuron: Figure 1B2): the excitatory Schaffer input from the ipsilateral CA3 region (in red); and two inhibitory inputs, one perisomatic (in green) and another making contact in the distal third of apical dendrites (in blue). These three inputs resemble the anatomical descriptions of the more conspicuous LFP-generators of the CA1 region identified in previous experiments [7,36]. For simplicity, the Schaffer-like input was restricted to a single band in the apical tree. For excitatory and inhibitory inputs, we used the kinetics of non-N-methyl-D-aspartate glutamate and GABA_A receptors, respectively.

All target neurons in the aggregate received the same inputs, which ensured that the contributions to the LFPs calculated over a vertical tract at the center of the slab were proportional (Figure 1B3). For each input we simulated ongoing bombardment through afferent axons with either rhythmic (Schaffer input: see sample in Figure 1B1) or random-like (Poisson distribution) spike trains (inhibitory inputs). The perisomatic inhibitory input was homogeneously distributed over a dendritic band from 50 μm into the basal tree through to 100 μm into the apical tree (neuronal length = 750 μm), and at a total mean frequency of 300 inputs per second. The apical distal inhibition was applied to cell compartments 400 to 500 μm from the cell soma (equivalent to the st. lacunosum-moleculare, l-m), and the temporal activation was built by blending two independent temporal series of random inputs (joint mean frequency of 260 inputs/sec), in turn modulated with random on/off periods. This procedure permits stronger time fluctuations and hence, a large relative variance is introduced by this input into composite LFPs (>50%) [7]. The Schaffer input was delivered to apical compartments at regular intervals between 150 to 300 μm from the cell soma (40 Hz).

5.2 Single cell model. We simulated the dynamics of a realistic neuron model with the average branching, total dendritic length, and dendritic tapering of CA1 pyramidal neurons, as well as the appropriate variations in spine density described in detailed morphometric studies [55,56,57]. This model neuron has been tested thoroughly elsewhere [33,34,35,54,58,59].

The compartmental model neuron has been described elsewhere in detail and its cell morphology can be found at <http://www.cajal.csic.es/departamentos/herrerias-espinosa/ca12011/index.html>. The length of the compartments λ was always between >0.01 and <0.2. The total effective area of the neuron was 66,800 μm^2 (including the spine area), the membrane capacitance (C_m) was 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, and the internal resistivity (R_i) was 100 $\Omega\cdot\text{cm}$. The membrane resistivity (R_m) was 50 $\text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ for the soma and it varied in the dendrites (see above URL for details). The input resistance measured at the soma was 60 M Ω and the time constant was 18 ms. Dendritic spines were collapsed into the parent dendrites. As a result, the values of R_m and C_m of the parent compartments were compensated accordingly. For apical dendrites the surface ratio between the spines and parental dendrites was set to 1:1 [56] and thus, we used a correction factor of two for spiny compartments (i.e., the R_m was halved and the C_m doubled).

We used twelve different types of ion channels to simulate the active properties of the cell membrane: two transient sodium currents in the axon and soma/dendrites; two calcium currents (high- and low-threshold); one hyperpolarization-activated "h" current; and seven potassium currents. These potassium conductances represented delayed rectifiers (one axonal and one somato/dendritic), a small persistent muscarinic type current, a transient A-type current (one proximal and one distal), a short-duration [Ca]- and a voltage-dependent and long duration [Ca]-dependent current. The conductance variables were described using a Hodgkin-Huxley type formalism (see details of the kinetics in Refs. 58,59 and the URL above). The reversal potentials for ion channels were set to $E_{\text{Na}} = 50$ mV and $E_{\text{K}} = -90$ mV. E_{Ca} was considered variable and dependent on the calcium concentration.

The channel distribution along the cell was tuned to accurately reproduce the unitary and population electrogenesis of the CA1 region [33,59]. In this study the densities of axonal conductances were diminished by a factor of 100 to avoid somato/axonal spike firing, while dendritic recruitment of V-dependent channels was permitted. Such tuning was required to limit cell firing which hampers the interpretation of the intracellular interactions between subthreshold currents.

The synaptic currents were modeled using the following equations:

$$I_{\text{syn}}(t) = g_{\text{syn}}(t) (V_m - E_{\text{syn}}) \quad (5)$$

$$g_{\text{syn}}(t) = \hat{g}_{\text{syn}} \left(\frac{t}{\tau_{\text{syn}}} \right) \exp \left(1 - \frac{t}{\tau_{\text{syn}}} \right), \quad t > 0 \quad (6)$$

with τ_{syn} values of 2 and 7 ms, and a reversal potential E_{syn} of 0 and -75 mV for glutamatergic and GABA_A inputs, respectively. For the sake of simplicity, the synaptic conductances were homogeneously distributed along the

surface of all the dendritic branches within the activated band. Conductances of 15 and 35 nS were assigned the perisomatic and distal GABA inputs, respectively. The rhythmic Schaffer input was varied from 2-8 nS to reproduce the varying amplitude of successive excitatory wavelets or μ -fEPSPs in vivo. This range of conductance was normally subthreshold for local dendritic spikes [58].

Neuronal dynamics and transmembrane currents were calculated using the GENESIS simulator [60]. An exponential (explicit) Euler method was used with the integration step of 1 μ s.

5.3 Aggregate model. The dorsal CA1 region was modeled as a slab of tissue containing an aggregate of 16,966 morphologically identical units forming a palisade-like planar structure (1 x 1 mm: Figure 1B3). We preserved an experimentally observed cell density of 64 neurons in a 50 x 50 μ m antero-lateral lattice [61], with their main axes in parallel and their soma contained in a cell body layer 50 μ m thick, arranged as 4 uneven layers with 66% on the apical side, and 22% and 11% in the two basal layers. The dorso-ventral extension was set at 0.8 mm. As we employed homogeneous activation throughout the population of target neurons, the estimation of compartmental currents was made based on a single unit and the activation of the entire population was then mimicked by replicating the currents in all neurons of the aggregate (see below). In selected runs we checked for the possible effects of anatomical cell-to-cell variability by introducing free axial rotation in units, moderate vertical jitter (one layer vs. 4-layered somata distributions), and random vertical jitter (within \pm 50 μ m) in the coordinates of cell compartments. We had previously checked that the macroscopic averaging dampened microscopic differences [33,34].

5.4 Calculation of model LFPs. We assumed a homogeneous unbounded conductive medium with a constant extracellular conductivity, $\sigma = 0.3$ S/m [50]. Thus, the current spread in the extracellular space Ω can be modeled by the Poisson equation:

$$-\sigma \Delta \phi(x, t) = \sum I_j(t) \delta(x - x_j), \quad x \in \Omega \quad (7)$$

where $I_j(t)\delta(x-x_j)$ are the point transmembrane current sources with amplitude $I_j(t)$ obtained in the simulation of the dynamics of pyramidal neurons, and the sum extends over all the cells in the aggregate and their compartments. Using the fundamental solution of the Laplace operator in R^3 we can approximate the potential near to the center of the neuronal slab as:

$$\phi(x, t) = -\frac{1}{4\pi\sigma} \sum \frac{I_j(t)}{r_j} \quad (8)$$

where $r_j = \|x - x_j\|$ is the Euclidian distance to the corresponding compartment. To simulate electrophysiological recordings, we placed 16 virtual recording points $h=50$ μ m apart spanning from 250 μ m above to 500 μ m below the cell body at the center of the population, in parallel to the somato-dendritic axis. The simulated LFPs are given by

$$u_k(t) = \phi(0, 0, kh, t) \quad (9)$$

Calculations of LFPs were programmed in custom MatLab code.

Acknowledgements

We thank R Núñez and JM Ibarz for technical assistance and comments, and M. Sefton at BiomedRed for editorial support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OH. Performed the experiments: GMV JM. Analyzed the data: GMV JM VAM. Contributed reagents/materials/analysis tools: VAM OH. Wrote the manuscript: OH.

References

- Bullock TH, McIlune MC, Enright JT (2003) Are the electroencephalograms mainly rhythmic? Assessment of periodicity in wide-band time series. *Neuroscience* 121: 233-252. doi:10.1016/S0306-4522(03)00208-2. PubMed: 12946714.
- Lopes da Silva F (1991) Neural mechanisms underlying brain waves: from neural membranes to networks. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 79: 81-93. doi:10.1016/0013-4694(91)90044-5. PubMed: 1713832.
- Freeman WJ (1978) Spatial properties of an EEG event in the olfactory bulb and cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 44: 586-605. doi:10.1016/0013-4694(78)90126-8. PubMed: 77765.
- Bressler SL (1987) Relation of olfactory bulb and cortex. I. Spatial variation of bulbocortical interdependence. *Brain Res* 409: 285-293. doi:10.1016/0013-4694(78)90126-8. PubMed: 77765.
- Neville KR, Haberly LB (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol* 90: 3921-3930. doi:10.1152/jn.00475.2003. PubMed: 12917385.
- Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Benito N, Herreras O (2012) Schaffer-specific local field potentials reflect discrete excitatory events at gamma-frequency that may fire postsynaptic hippocampal CA1 units. *J Neurosci* 32: 5165-5176. doi:10.1523/JNEUROSCI.4499-11.2012. PubMed: 22496562.
- Benito N, Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Makarova J, Korovaichuk A, Herreras O (2013) Spatial modules of coherent activity in pathway-specific LFPs in the hippocampus reflect topology and different modes of presynaptic synchronization. *Cereb Cortex*: ([MedlinePgn:]) doi: 10.1093/cercor/bht022. PubMed: 23395845.
- Makarov VA, Makarova J, Herreras O (2010) Disentanglement of local field potential sources by independent component analysis. *J Comput Neurosci* 29: 445-457. doi:10.1007/s10827-009-0206-y. PubMed: 20094907.
- Belluscio MA, Mizuseki K, Schmidt R, Kempter R, Buzsáki G (2012) Cross-frequency phase-phase coupling between θ and γ oscillations in the hippocampus. *J Neurosci* 32: 423-435. doi:10.1523/JNEUROSCI.4122-11.2012. PubMed: 22238079.
- Scheffer-Teixeira R, Belchior H, Caixeta FV, Souza BC, Ribeiro S et al. (2012) Theta phase modulates multiple layer-specific oscillations in the CA1 region. *Cereb Cortex* 22: 2404-2414. doi:10.1093/cercor/bhr319. PubMed: 22079925.
- Rodríguez R, Haberly LB (1989) Analysis of synaptic events in the opossum piriform cortex with improved current source-density techniques. *J Neurophysiol* 61: 702-718. PubMed: 2723716.
- Fernández-Ruiz A, Herreras O (2013) Identifying the synaptic origin of ongoing neuronal oscillations through spatial discrimination of electric fields. *Front. J Comput Neurosci* 5: 7. doi:10.3389/fncom.2013.00005.
- Lorente de Nó R (1947) Analysis of the distribution of action currents of nerves in volume conductors. In: *A Study of Nerve Physiology*, New York: The Rockefeller Institute, vol. 132, pp. 384-477.

14. Woodbury JW (1960) Potentials in a volume conductor. In TC RuchJF Fulton. Medical Physiology and biophysics. Philadelphia and London: WB Saunders Co., pp 83-91.
15. Plonsey R (1969) Bioelectric phenomena. New York: McGraw-Hill.
16. Elul R (1972) The genesis of the EEG. *Int Rev Neurobiol* 15: 228-272. PubMed: 4949975.
17. Gloor P (1985) Neuronal generators and the problem of localization in electroencephalography: Application of volume conductor theory to electroencephalography. *J Clin Neurophysiol* 2: 327-354. doi: 10.1097/00004691-198510000-00002. PubMed: 4056020.
18. Niedermeyer E (1996) Dipole theory and electroencephalography. *Clin Electroencephalogr* 27: 121-131. PubMed: 8828975.
19. Nunez PL, Srinivasan R (2006) Electric Fields of the Brain: The Neurophysics of EEG. 2nd edition. New York: Oxford University Press.
20. Freeman JA, Nicholson C (1975) Experimental optimization of current source-density technique for anuran cerebellum. *J Neurophysiol* 38: 369-382. PubMed: 165272.
21. Rappelsberger P, Pockberger H, Petsche H (1981) Current source density analysis: methods and application to simultaneously recorded field potentials of the rabbit's visual cortex. *Pflügers Arch* 389: 159-170. doi:10.1007/BF00582108. PubMed: 6259585.
22. Mitzdorf U, Singer W (1977) Laminar segregation of afferents to lateral geniculate nucleus of the cat: an analysis of current source density. *J Neurophysiol* 40: 1227-1244. PubMed: 925725.
23. Herreras O (1990) Propagating dendritic action potential mediates synaptic transmission in CA1 pyramidal cells in situ. *J Neurophysiol* 64: 1429-1441. PubMed: 2178183.
24. Golarai G, Sutula TP (1996) Bilateral organization of parallel and serial pathways in the dentate gyrus demonstrated by current-source density analysis in the rat. *J Neurophysiol* 75: 329-342. PubMed: 8822561.
25. Wu K, Canning KJ, Leung LS (1998) Functional interconnections between CA3 and the dentate gyrus revealed by current source density analysis. *Hippocampus* 8: 217-230. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3. PubMed: 9662137.
26. Brankack J, Stewart M, Fox SE (1993) Current source density analysis of the hippocampal theta rhythm: associated sustained potentials and candidate synaptic generators. *Brain Res* 615: 310-327. doi: 10.1016/0006-8993(93)90043-M. PubMed: 8364740.
27. Ketchum KL, Haberly LB (1993) Synaptic events that generate fast oscillations in piriform cortex. *J Neurosci* 13: 3980-3985. PubMed: 8366356.
28. Bragin A, Jandó G, Nádasdy Z, Hetke J, Wise K et al. (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15: 47-60. PubMed: 7823151.
29. Ylinen A, Bragin A, Nádasdy Z, Jandó G, Szabó I et al. (1995) Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci* 15: 30-46. PubMed: 7823136.
30. Steriade M, Amzica F (1996) Intracortical and corticothalamic coherency of fast spontaneous oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2533-2538. doi:10.1073/pnas.93.6.2533. PubMed: 8637909.
31. Castro-Alamancos MA (2000) Origin of synchronized oscillations induced by neocortical disinhibition in vivo. *J Neurosci* 20: 9195-9206. PubMed: 11124997.
32. Mann EO, Suckling JM, Hajos N, Greenfield SA, Paulsen O (2005) Perisomatic feedback inhibition underlies cholinergically induced fast network oscillations in the rat hippocampus in vitro. *Neuron* 45: 105-111. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.016. PubMed: 15629706.
33. Varona P, Ibarz JM, López-Aguado L, Herreras O (2000) Macroscopic and subcellular factors shaping CA1 population spikes. *J Neurophysiol* 83: 2192-2208. PubMed: 10758128.
34. Makarova J, Makarov VA, Herreras O (2010) A model of sustained field potentials based on gradients of polarization in single neurons. *J Neurophysiol* 103: 2446-2457. doi:10.1152/jn.01045.2009. PubMed: 20220074.
35. Makarova J, Ibarz JM, Makarov VA, Benito N, Herreras O (2011) Parallel readout of pathway-specific inputs to laminated brain structures. *Front Syst Neurosci* 5: 77. doi:10.3389/fnsys.2011.00077. PubMed: 21949504.
36. Korovaichuk A, Makarova J, Makarov VA, Benito N, Herreras O (2010) Minor contribution of principal excitatory pathways to hippocampal LFPs in the anesthetized rat: a combined independent component and current source density study. *J Neurophysiol* 104: 484-497. doi: 10.1152/jn.00297.2010. PubMed: 20463202.
37. Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Herreras O (2012) Sustained increase of spontaneous input and spike transfer in the CA3-CA1 pathway following long term potentiation in vivo. *Front Neural Circuits* 6: 71. PubMed: 2306075210339/fncir.2012.00071.
38. Fernández-Ruiz A, Muñoz S, Sancho M, Makarova J, Makarov VA, Herreras O (2013) Cytoarchitectonic and dynamic origins of giant positive LFPs in the Dentate Gyrus. *J Neurosci* (in press).
39. Bullock TH, Buzsáki G, McClune MC (1990) Coherence of compound field potentials reveals discontinuities in the CA1-subiculum of the hippocampus of the freely moving rats. *Neuroscience* 38: 609-619. doi: 10.1016/0306-4522(90)90055-9. PubMed: 2270136.
40. Florian G, Andrew C, Pfurtscheller G (1998) Do changes in coherence always reflect changes in functional coupling? *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 106: 87-91. doi:10.1016/S0013-4694(97)00105-3. PubMed: 9680169.
41. Ray S, Maunsell JHR (2010) Differences in gamma frequencies across visual cortex restrict their possible use in computation. *Neuron* 67: 885-896. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.004. PubMed: 20826318.
42. Buzsáki G, Czopf J, Kondákor I, Kellényi L (1986) Laminar distribution of hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat: current-source density analysis, effects of urethane and atropine. *Brain Res* 365: 125-137. doi:10.1016/0006-8993(86)90729-8. PubMed: 3947979.
43. Lopes da Silva FH, Vos JE, Mooibroek J, Van Rotterdam A (1980) Relative contributions of intracortical and thalamo-cortical processes in the generation of alpha rhythms, revealed by partial coherence analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 50: 449-456. doi: 10.1016/0013-4694(80)90011-5. PubMed: 6160987.
44. Kocsis B, Bragin A, Buzsáki G (1999) Interdependence of Multiple Theta Generators in the Hippocampus: a Partial Coherence Analysis. *J Neurosci* 19: 6200-6212. PubMed: 10407056.
45. Łęski S, Kublik S, Swiejkowski DA, Wróbel A, Wójcik DK (2010) Extracting functional components of neural dynamics with independent component analysis and inverse current source density. *J Comput Neurosci* 29: 459-473. doi:10.1007/s10827-009-0203-1. PubMed: 20033271.
46. Traub RD, Bibbig A, LeBeau FE, Buhl EH, Whittington MA (2004) Cellular mechanisms of neuronal population oscillations in the hippocampus in vitro. *Annu Rev Neurosci* 27: 247-278. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144303. PubMed: 15217333.
47. Herreras O, Solís JM, Muñoz MD, Martín del Río R, Lerma J (1988) Sensory modulation of hippocampal transmission. I. Opposite effects on CA1 and dentate gyrus synapses. *Brain Res* 451: 290-302.
48. Canals S, López-Aguado L, Herreras O (2005) Synaptically-recruited apical currents are required to initiate axonal and apical spikes in hippocampal pyramidal cells: modulation by inhibition. *J Neurophysiol* 93: 909-918. PubMed: 15456800.
49. Chen A (2006) Fast kernel density independent component analysis. *Lecture Notes Comput Sci* 3889: 24-31. doi:10.1007/11679363_4.
50. López-Aguado L, Ibarz JM, Herreras O (2001) Activity-dependent changes of tissue resistivity in the CA1 region in vivo are layer-specific: modulation of evoked potentials. *Neuroscience* 108: 249-262. doi: 10.1016/S0306-4522(01)00417-1. PubMed: 11734358.
51. Pavlov AN, Makarov VA, Mosekilde E, Sosnovtseva OV (2006) Application of wavelet-based tools to study the dynamics of biological processes. *Brief Bioinform* 7: 375-389. doi:10.1093/bib/bbl041. PubMed: 17118945.
52. Pavlov AN, Makarov VA, Makarova I, Panetos F (2007) Sorting of extracellular spikes: When wavelet based methods outperform the principle component analysis. *Nat Comput* 6: 269-281. doi:10.1007/s11047-006-9014-8.
53. Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Buzsáki G (1998) Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. *Neuron* 21: 179-189. doi:10.1016/S0896-6273(00)80525-5. PubMed: 9697862.
54. López-Aguado L, Ibarz JM, Varona P, Herreras O (2002) Structural inhomogeneities differentially modulate action currents and population spikes initiated in the axon or dendrites. *J Neurophysiol* 88: 2809-2820. doi:10.1152/jn.00183.2002. PubMed: 12424314.
55. Bannister NJ, Larkman AU (1995) Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns. *J Comp Neurol* 360: 150-160. doi:10.1002/cne.903600111. PubMed: 7499560.
56. Bannister NJ, Larkman AU (1995) Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: II. Spine distributions. *J Comp Neurol* 360: 161-171. doi:10.1002/cne.903600112. PubMed: 7499561.
57. Trommald M, Jensen V, Andersen P (1995) Analysis of dendritic spines in rat CA1 pyramidal cells intracellularly filled with a fluorescent dye. *J Comp Neurol* 353: 260-274. doi:10.1002/cne.903530208. PubMed: 7745135.
58. Ibarz JM, Makarova I, Herreras O (2006) Relation of apical dendritic spikes to output decision in CA1 pyramidal cells during synchronous

- activation: a computational study. *Eur J Neurosci* 23: 1219-1233. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04615.x. PubMed: 16553784.
59. Makarova J, Ibarz JM, Canals S, Herreras O (2007) A steady-state model of spreading depression predicts the importance of an unknown conductance in specific dendritic domains. *Biophys J* 92: 4216-4232. doi:10.1529/biophysj.106.090332. PubMed: 17400694.
 60. Bower JM, Beeman D (1998) *The book of Genesis. Exploring Realistic Neural Models with the GEneral NEural Simulation System*. 2nd Edition. New York: Springer Verlag.
 61. Boss BD, Turlejski K, Stanfield BB, Cowan WM (1987) On the numbers of neurons in fields CA1 and CA3 of the hippocampus of Sprague-Dawley and Wistar rats. *Brain Res* 406: 280-287. doi: 10.1016/0006-8993(87)90793-1. PubMed: 3567627.



ORIGINAL ARTICLE

Diversity of LFPs Activated in Different Target Regions by a Common CA3 Input

Gonzalo Martín-Vázquez¹, Nuria Benito^{1,4}, Valeri A. Makarov^{2,3},
Oscar Herreras¹ and Julia Makarova¹

¹Department of Systems Neuroscience, Cajal Institute—CSIC, Madrid 28002, Spain, ²Department of Applied Mathematics, Faculty of Mathematics, Instituto de Matemática Interdisciplinar, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain, ³N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod 603950, Russia and ⁴Current address: Institute for Cellular and Integrative Neuroscience, CNRS UPR 3212 - 5 rue Blaise Pascal, Strasbourg 67084, France

Address correspondence to Oscar Herreras, Cajal Institute—C.S.I.C., Av. Dr. Arce 37, Madrid 28002, Spain. Email: herreras@cajal.csic.es; Julia Makarova, Cajal Institute—C.S.I.C., Av. Dr. Arce 37, Madrid 28002, Spain. Email: makarovaj@cajal.csic.es

Abstract

Identifying the pathways contributing to local field potential (LFP) events and oscillations is essential to determine whether synchronous interregional patterns indicate functional connectivity. Here, we studied experimentally and numerically how different target structures receiving input from a common population shape their LFPs. We focused on the bilateral CA3 that sends gamma-paced excitatory packages to the bilateral CA1, the lateral septum, and itself (recurrent input). The CA3-specific contribution was isolated from multisite LFPs in target regions using spatial discrimination techniques. We found strong modulation of LFPs by target-specific features, including the morphology and population arrangement of cells, the timing of CA3 inputs, volume conduction from nearby targets, and co-activated inhibition. Jointly they greatly affect the LFP amplitude, profile, and frequency characteristics. For instance, ipsilateral (Schaffer) LFPs occluded contralateral ones, and septal LFPs arise mostly from remote sources while local contribution from CA3 input was minor. In the CA3 itself, gamma waves have dual origin from local networks: in-phase excitatory and nearly antiphase inhibitory. Also, waves may have different duration and varying phase in different targets. These results indicate that to explore the cellular basis of LFPs and the functional connectivity between structures, besides identifying the origin population/s, target modifiers should be considered.

Key words: CA3, gamma oscillations, LFP biophysics, local field potentials, neuron models

Introduction

Despite constituting a reduced fraction of total brain activity (Bullock et al. 2003), network oscillations underlie important computational mechanisms related to the timing of inputs and the formation of neuron assemblies. Each neuron population participates in various cognitive and behavioral processes by routing its output to several brain regions. Such spreading of seemingly similar information may be traced over time and space by studying the compound postsynaptic currents that generate local field potentials (LFPs) in target areas (Elul 1971; Nunez and Srinivasan

2006). However, the extension of the electric field far away from the neurons generating the current causes a broad spatial overlap of contributions from different origin populations. This challenges the question whether correlated LFPs in different regions reflect synaptically connected populations (Eckhorn et al. 1988; Bressler et al. 1993; Roelfsema et al. 1997) or whether they are due to a common driving population (Chawla et al. 2001; Rajagovindan and Ding 2008). Previous theoretical and experimental studies described multiple factors that affect the amplitude and spatial extension of LFPs, such as the cytoarchitecture of

postsynaptic cells and the 3D configuration of synaptic territories (Lindén et al. 2011; Fernández-Ruiz et al. 2013; Benito et al. 2014). It is therefore intuitive that the same output of a neuron population may produce essentially different LFPs in distinct target structures.

We sought evidence for this inference by comparing the LFPs produced by the main targets of a single population of neurons, the hippocampal CA3 pyramidal population (Swanson et al. 1981): the ipsi- and contralateral CA1 regions, the lateral septum (LS), and the CA3 itself. The CA3 is an important bilateral hub where ascending pathways and cortical information meet (Vinogradova 2001). The CA1 receives bilateral CA3 projections in similar but not identical synaptic territories (Blackstad 1956; Laurberg 1979), conveying an elaborated output to the cortex that is required for spatial navigation and sensory processing. The CA3-LS projection provides hippocampal feedback that regulates sensory input and the theta rhythm and participates in anxiety and reward (Pedemonte et al. 1998; Takamura et al. 2006; Chee et al. 2015). Importantly, it terminates on interneurons with a cytoarchitecture entirely different to hippocampal pyramidal cells (Panula et al. 1984). Finally, the auto-associative CA3 network has been proposed to participate in pattern completion and gamma generation (Csicsvari et al. 2003; Le Duigou et al. 2014). Thus, the CA3 output is sent to both architectonically similar (ipsi- and contralateral CA1) and different (CA1, CA3 and LS) regions.

CA3 assemblies send excitatory packages in regular succession that produce bouts of gamma-paced LFPs in the CA1 (Fernández-Ruiz et al. 2012a,b). The very same ongoing input arrives to all CA3 targets since 1) the CA3 region is antidromically driven from all of them and 2) the targets display monosynaptic evoked potentials (EPs) and unit firing upon electrical stimulation of the CA3 or the fimbria (DeFrance et al. 1973; McLennan and Miller 1974; McNaughton and Miller 1986; Herreras et al. 1987; Herreras 1990; Leung et al. 2008). We explore the spatiotemporal determinants of CA3-originated LFPs and EPs in anesthetized rats combining experimental and modeling techniques. To isolate the CA3-elicited LFPs in each region, we used an approach based on independent component analysis (ICA: Bell and Sejnowski 1995) that enables pathway-specific LFP generators to be separated from multisite recordings (Makarova et al. 2011; Glabska et al. 2014).

We show that the same CA3 population produces large or negligible LFPs in different target regions and may display different frequency characteristics. The LFP power depends, nonintuitively, on the combination of geometry, strength of activation, volume conduction from nearby targets, relative timing of convergent inputs and concurrent inhibition. The latter also explains the discrepancy between spatial profiles of LFPs and EPs.

Materials and Methods

Experimental Procedures

All experiments were performed in accordance with EU (86/609/EU) and Spanish (BOE 67/8509-12, 1988) regulations regarding the use of laboratory animals, and the experimental protocols were approved by the Research Committee of the Cajal Institute.

Adult female Sprague–Dawley rats were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic device, and the surgical and stereotaxic procedures were performed as described previously (Herreras et al. 1988; Canals et al. 2005). Concentric stimulating electrodes made with a 26G outer cannula and a 125- μ m tungsten wire coated except 150 μ m at the tip were placed bilaterally at homotopic sites in the soma layer of

the CA3b region (AP: -2.9 ; L: ± 2.6 ; V: 3.4 mm from bregma and cortical surface) to activate simultaneously the main CA3 targets (Fig. 1A). Recordings were obtained with 2 linear multisite silicon probes (32 sites, 50 μ m intersite distance: Neuronexus) either in homotopic sites of the left and right CA1 or in the left CA1 (AP: 4.5–5.5; L: ± 2.6 ; V: 2–3.6 mm) and in the LS (AP: 0.4; L: 0.4; V: 3.8–5.4 mm). Hippocampal probes also spanned the CA3 or DG/CA3 regions. In some experiments, glass pipettes were also used. Linear probes were soaked in DiI before insertion (Molecular Probes, Invitrogen) to assess their placement in histological sections postmortem (Supplementary Fig. 1). A silver chloride wire implanted under the skin of the neck served as a reference for recordings. Signals were amplified and acquired using MultiChannel System (Reutlingen) hardware and software at a 50 kHz sampling rate.

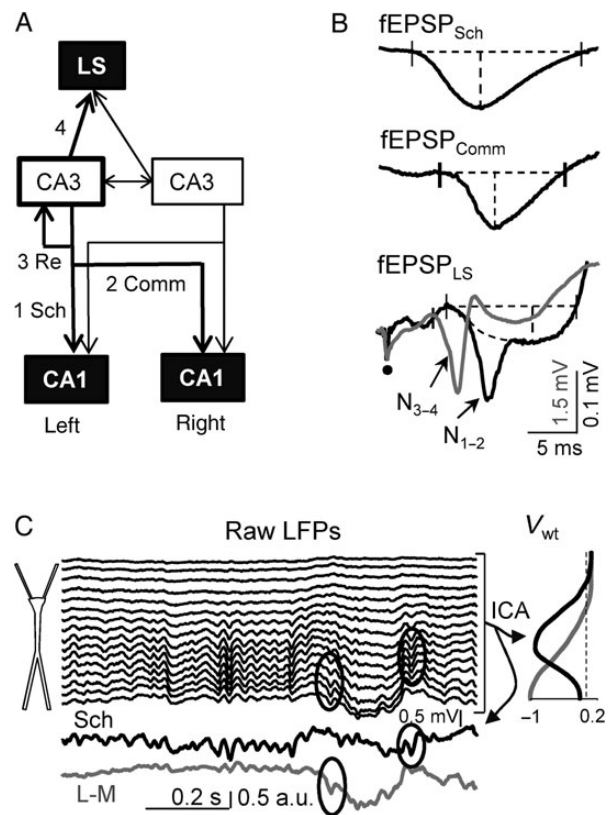


Figure 1. Spontaneous and evoked LFP activity produced by the main targets of CA3 pyramidal cells. (A) Block scheme of main efferent connections of the bilateral CA3 population. We explored the following pathways: 1—ipsilateral CA3→CA1 (Schaffer), 2—contralateral CA3→CA1 (Commissural), 3—recurrent CA3→CA3 (Re), 4—CA3→LS. (B) CA3-evoked field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) in different regions. The septal fEPSP is presented at low (black) and high (gray) stimulus intensities. The 2 presented fEPSP/spike negative complex (N_{1-2} , and N_{3-4} , respectively) of different latency, amplitude (note vertical scale), and spatial coverage (Supplementary Fig. 2 for spatial characterization). Intervals marked by dashed lines correspond to the amplitude and duration of fEPSPs. Dot marks the onset of stimulation. (C) Extraction of pathway-specific LFP components by ICA. Upper traces belong to linear recordings of a sample epoch across CA1 layers, and lower traces show the temporal activation of 2 found LFP generators (black: Schaffer-LFPs; gray: lacunosum-molecular LFPs). Curves in the right panel show spatial weights (V_{wt}) of the corresponding LFP generators with maxima in the layer of synaptic band. Bouts of gamma band dominate the Schaffer-LFPs and were also present in the L-M LFPs along with slower waves. Gamma waves may appear in one or coincide in both LFP generators. Note the efficiency of separation in isolated waves occupying different sets of contiguous electrodes (ovals).

To discriminate the ipsilateral from the contralateral CA3 contribution to CA1 LFPs, the CA3 was reversibly silenced in the left side by injecting microdrops (0.1–0.2 μL) of lidocaine through a 200- μm -wide silica cannula inserted in the cannula of the concentric stimulating electrode along with the inner wire. Microdrops were delivered through a 5- μL Hamilton syringe connected to the assembly through a plastic tube. The extension of the drug was monitored by the modulation of EPs elicited by the ipsi- and/or contralateral CA3, whose fibers pass above the injection site on their way from the fimbria to the CA1. Typically 1 or 2 injections were sufficient to ensure complete blockade of ipsilateral CA1 fEPSPs, which was stable for at least 10 min. In a subset of experiments requiring longer drug actions, successive microdrops were injected at 5-min intervals, resulting in reasonable stability as witnessed by the selective steady effect on ipsilateral CA1 fEPSPs.

In a subset of experiments, we used recording pipettes back-filled with a saline solution of the GABA_A blocker Bicuculline (Bic; 1 mM) to deliver microdrops locally near the linear probe in specific CA1 layers, guiding the placement by the characteristic evoked potential.

At the end of each experiment, the animals were perfused through the abdominal aorta with PBS containing heparin (0.1%) followed by paraformaldehyde (4%). Sagittal brain sections (100 μm) were then stained with bis-benzimide, and the electrode position was assessed by fluorescence microscopy (Supplementary Fig. 1).

Evoked Activity

Monosynaptic CA3-evoked responses were sought in all target regions (Fig. 1A) by stimulating the left CA3b to obtain CA3-specific spatial profiles and to assess the relative amplitude of fEPSPs. These EPs have been used to identify the LFP generator corresponding to the CA3 input in different targets (Korovaichuk et al. 2010; Benito et al. 2014). CA1 fEPSPs evoked by stimulation of the ipsi- or contralateral CA3b regions (termed the Schaffer and Commissural pathways, respectively; CA1_{Sch} and CA1_{Comm} in Fig. 1B) are well known (e.g., McNaughton and Miller 1986; Herreras 1990; Leung et al. 2008) and display characteristic field potential and current-source density (CSD) profiles (Supplementary Fig. 2). The EPs elicited in the LS from the fornix-fimbria have also been explored previously (e.g., DeFrance et al. 1973), yet less thoroughly when induced from the CA3 itself. Here, we found a more complex response than described earlier. Particularly, following weak stimuli (<150 μA) that already produced a sizable fEPSP in the CA1, the LS developed a negative complex, termed N₁₋₂ (fEPSP_{LS} black trace in Fig. 1B) that preceded a large positive wave P₁, neither of which had been reported earlier. Such complex includes a slow (N₁) and a fast component (N₂), interpreted as a synaptic and spike component, respectively, since the latter was blocked by conditioning pulses and did not follow repetitive stimulation. The N₁₋₂ complex had a similar temporal but not spatial structure as another negative complex obtained with stronger stimuli, termed N₃₋₄ (gray trace in Fig. 1B and Supplementary Fig. 2), which apparently corresponds to the fimbria-fornix EP described previously by DeFrance et al. (1973). This developed 100–150 μm more ventrally and extended over a larger dorso-ventral portion of the LS. It also had a seemingly shorter latency, and it largely overlapped the smaller N₁₋₂ response, the presence of which could only be discerned in CSD profiles (see below). Due to the lower threshold, we used the N₁₋₂ as a more genuine monosynaptic LS response to CA3 stimuli, although the N₃₋₄ may be also a monosynaptic response of a different population in the LS.

The duration of the fEPSPs in each target region was measured as indicated in Figure 1B by the horizontal intervals. The beginning of the corresponding sink in the CSD was used as the starting time, as it can be more clearly discerned from the baseline than that in the EPs. The fEPSP amplitude (vertical dashed lines) was estimated at the maximum negativity over the whole duration in the CA1 and after the N₂ spike component in the LS. Admittedly, the fEPSP measurements in the LS may be contaminated by the spike (N₂) and subsequent inhibitory wave (P₁). Thus, these values were mostly used as landmarks to identify the origin of the LFP components (see below).

Stimulus–response curves in the CA1 were obtained by stimulating the left CA3 (30–900 μA , 0.1 ms pulses delivered at 0.2 Hz) and recording bilaterally with 2 micropipettes placed in the stratum (st.) radiatum where the fEPSP attains near maximal amplitude for the ipsi- and contralateral inputs (typically 250–300 μm below the soma layer). The fEPSP was measured as the maximum rate of rise of its negative limb. Except when indicated, averages used 6–8 responses. Threshold intensity was considered that producing 50% measurable responses in the CA1 st. radiatum.

Computational Models

Ongoing LFPs were numerically simulated using realistic tridimensional aggregates of the CA1 and the LS regions in compartmental model cells with Hodgkin–Huxley dynamics. For the CA1, the morphology, electrotonic parameters, and subcellular distribution of active channels in the neuron were as reported earlier (Varona et al. 2000; Makarova et al. 2011; Martín-Vázquez et al. 2013). Briefly, the pyramidal model neuron had average branching, total dendritic length, dendritic tapering, and variations in spine density observed in detailed morphometric studies (Banister and Larkman 1995a,b; Trommald et al. 1995). The model included 13 types of ion channels with an optimized subcellular distribution to simulate active somatodendritic properties (Ibarz et al. 2006). Excitatory Glutamate receptors of the non-NMDA type ($\tau = 2$ ms) were used to mimic the Schaffer and Commissural inputs. They were distributed within dendritic bands matching the anatomical synaptic territories (Laurberg 1979), that is, both inputs fully overlapped in basal dendrites (50–250 μm from the soma) and they partially overlapped in the apical tree (150–250 and 200–400 μm from the soma for Commissural and Schaffer inputs, respectively). The density of synaptic conductance was set to replicate the relative density of axon terminals (Shinohara et al. 2012). By default, we used 16.7 and 35.9 nS maximum conductance for the Commissural and Schaffer inputs, respectively, subthreshold for local dendritic spikes when distributed over a sufficiently large dendritic surface (Ibarz et al. 2006), and a basal-to-apical conductance density ratio of 2:1 for the Commissural and 1:4.5 for the Schaffer inputs. To mimic the timing of ipsi- and contralateral CA3 inputs to the CA1, the 2 inputs were activated nearly synchronously by series of pair-wise Sch and Comm excitatory gamma waves with bilateral random jitter of <2 ms. The intensity of the individual waves varied, reproducing realistic gamma sequences (Fernández-Ruiz et al. 2012a). The conductance densities, basal-to-apical ratio, bilateral gamma jitter, and the mean lag time were systematically varied in different simulations to check the interactions between different factors. Compartmental currents were estimated in a single CA1 pyramidal unit, and the activation of a block of tissue (1 \times 1 \times 0.8 mm) containing 16 966 units that form a palisade-like planar structure was then obtained by replicating the currents through a system of spatial coordinates (Makarova et al. 2011).

In a subset of simulations, we evaluated the volume conduction from nearby co-activated CA3 regions to CA1 LFPs by including in the model a CA3-like structure made of two $1 \times 1 \times 0.8$ mm planar blocks that jointly with that of CA1 form the characteristic C-shape configuration of the CA1–CA3 regions. CA3 pyramidal cells were tilted accordingly. For CA3, we used identical neuron prototypes as for the CA1 units since the estimation of distant field potential values is far more dependent on the location of the synaptic territory than the minor differences in CA3 and CA1 overall cytoarchitecture.

For the LS, we built a prototypic neuron adopting the interneuron morphology reported in anatomical studies (Alonso and Frotscher 1989; Jakab and Leranth 1990). The model neuron consisted of 25 compartments distributed in a soma ($14 \mu\text{m}$ diameter) and 4 main dendrites with a total surface of $2850 \mu\text{m}^2$. We did not implement active dendritic conductances due to the absence of specific data. In former model studies, we found that their contribution becomes only significant for moderate-to-high input synchronization, which is stronger than that of the baseline activity employed here. The CA3 input was simulated by homogeneously scattering excitatory conductances throughout dendritic compartments, except the $25\text{-}\mu\text{m}$ segments closest to the soma. The conductance density was set at $0.06 \text{ nS}/\mu\text{m}^2$, which was adjusted to obtain LFPs with a similar CA1/LS ratio as that found experimentally. We could not find detailed measurements of the 3D structure of the LS so by default we employed a total of 16 966 units scattered over a cubic volume of $1 \times 1 \times 1$ mm to make it comparable with the CA1 model. Larger volumes that preserved cell density were also tested. We used a similar orientation for all neurons as described in Jakab and Leranth (1990), and the 3D orientation of dendrites was set mildly axialized (see details in Supplementary Fig. 3).

In another group of simulations, we used an additional imaginary neuron prototype of intermediate morphological features that resembled a granule-cell like configuration, that is, only one polarized dendritic arbor. The unit had a total surface of $5221 \mu\text{m}^2$ and was built with 26 compartments distributed in a soma ($14 \mu\text{m}$ diameter) and 6 main dendrites globally fanning out distally by $<90^\circ$. The number of units and their arrangement in the volume were as for the LS prototype.

The transmembrane currents were calculated using the GENESIS simulator (Bower and Beeman 1998). The currents obtained were used to evaluate electric potentials created by point sources in R^3 assuming a constant conductivity of 0.33 S/m (López-Agudo et al. 2001). To compare with experimental results, we estimated LFPs at 16 sites along a linear track placed in the middle of the block simulating recordings with a multisite probe. The volume-conducted contribution of CA3 recurrent currents to ipsilateral CA1 potentials was estimated by linear addition of the fields created by the CA3 population blocks on the recording track through the CA1 block.

Current Source Density and Independent Component Analyses

Spatial information on the location of the sources of current underlying EPs and LFPs was achieved by CSD analysis and ICA, respectively. The CSD (Freeman and Nicholson 1975; Rappelsberger et al. 1981) determines the magnitude and location of the net transmembrane currents generated by neuronal elements within a small region of tissue. It provides the spatiotemporal distribution of sinks and sources, that is, inward and outward currents, respectively. Assuming constant conductivity of the extracellular space σ , we have: $\text{CSD} = -\sigma \Delta u$, where $u(t, x, y, z)$ is the electric

potential and Δ is the Laplace operator. Recording sites in multi-electrode arrays are equidistant, which facilitates the estimation of the Laplacian. For linear probes with M recording sites (usually $M = 16$ or 32), we used the one-dimensional approach, which calculates the CSD from the voltage distribution along the cells axis (Herreras 1990):

$$\text{CSD}_m(t) = -\frac{\sigma}{h^2} (u_{m-1}(t) - 2u_m(t) + u_{m+1}(t)),$$

where $u_m(t)$ is the LFP recorded at the m -th site and h is the inter-site distance. A number of factors may introduce error in the estimate, such as mutual cancellation between currents of different synaptic origin, heterogeneous tissue resistivity (López-Agudo et al. 2001), or the lack of DC baseline in standard AC-coupled recordings (Martín-Vázquez et al. 2013). The latter constitutes a major source of spurious currents when applied to ongoing (multisource) LFP profiles (cf. Fig. 1B in Fernández-Ruiz et al. 2012a), but not on short-lasting EP profiles for which a common baseline may be established by setting to zero all traces right before the stimulus artifact, thus minimizing the effects of concurrent ongoing activity (Herreras 1990). This also reduces the spatial noise and therefore we used no spatial smoothing. The CSDs are presented as spatiotemporal displays (chronotopograms) using interpolation over the CSD matrix to generate the isolines marking the levels of current density, and the maximum values of relevant components were measured. The CSD does not discriminate contributions from different pathways. Accordingly, in this study, we evaluated CSD for EPs only, but not for ongoing LFPs, and we used an alternative ICA approach to retrieve pathway-specific LFPs.

The ICA is a blind source separation technique routinely used to elucidate functional connectivity in multisite scalp EEG recordings or in fMRI (Makeig et al. 1997; Choi et al. 2005; Hutchison et al. 2010). The application of spatial ICA to intracranial LFPs (Fig. 1C) obtained with high-density multielectrode arrays (Makarov et al. 2010) enables a thorough study of the activity of neuron populations with subcellular precision in ordered structures (Korovaichuk et al. 2010), though is also efficient in glomerular and complex regions (Makarova et al. 2014). The approach assumes spatial immobility of the sources contributing to LFPs, which is fulfilled by subthreshold synaptic currents on account of the fixed location of the axon terminals. Recorded LFP signals $u_m(t)$ are modeled as the weighted sum of the activities of N neuronal sources or LFP generators:

$$u_m(t) = \sum_{n=1}^N V_{mn} s_n(t), \quad m = 1, 2, \dots, M,$$

where (V_{mn}) is the mixing matrix composed of the so-called voltage loadings or spatial weights of N LFP generators on M electrodes and $s_n(t)$ is the time course of the n -th LFP generator. Thus, the raw LFP observed at the m -th electrode tip is a linear mixture of the electrical activity of several independent LFP generators. Using $u_m(t)$, the ICA finds both (V_{mn}) and $s_n(t)$. The joint curve of spatial weights of an LFP generator (V_{wt} in Fig. 1C) reflects the instant depth profiles of proportional voltage among sites. Such curves can be compared with spatial distributions of standard EPs characteristic of each activated pathway. The time course of an LFP generator $s_n(t)$ can be considered as a postsynaptic temporal convolution of spike output in an afferent population (i.e., afferent spike trains), as shown previously for the CA3–CA1 pathway (Fernández-Ruiz et al. 2012a,b). The EPs are selectively captured in the temporal envelope of an LFP generator with a

matching spatial profile. This provides a means to identify the pathway and population of origin (Korovaichuk et al. 2010; Fernández-Ruiz et al. 2012a, 2013; Benito et al. 2014). The mathematical validation and practical limitations of this approach, as well as the possible sources of cross-contamination, have been thoroughly investigated using realistic modeling (Makarova et al. 2011, 2014). Once extracted from the raw LFPs, each LFP generator can be analyzed independently by re-constructing virtual LFPs produced by this single generator, $u^n(t) = V_n s_n(t)$. Then, the CSD in principal cells due to the n -th LFP generator is given by $I_n = -\sigma_n(t)\Delta V_n$. The CSD obtained for a single generator can be compared with profiles obtained during specific activation of known pathways (Makarova et al. 2011), which allows confirming that the source-sink distribution of pathway-specific LFPs matched that of EPs. Note that the application of CSD to virtual pathway-specific LFPs does not return spurious currents as the baseline can be experimentally retrieved even if only the AC part of LFPs is available (see Martín-Vázquez et al. 2013). This is made through an offset of virtual LFPs using the voltage weights of the corresponding ICA component, although it is not normally necessary for the Schaffer-LFPs when using low-frequency cut-off in the amplifier (0.1 Hz).

In this study, we employed the kernel density ICA algorithm (Chen 2006), customarily implemented in Matlab. ICA performance may differ somewhat depending on the temporal structure of the LFPs and the degree of spatial overlap of the original sources. Usually few ICA components (4–7 out of 32, a maximum defined by the number of electrodes) exhibited significant variance and distinct spatial distributions (Korovaichuk et al. 2010; Benito et al. 2014). This permits further optimization by pre-processing LFPs before performing the ICA through dimension reduction using the principal component analysis (PCA), which efficiently diminishes the presence of noisy weak generators (Makarova et al. 2011). The PCA also stabilizes and accelerates the subsequent convergence of the ICA (Makarov et al. 2010). We routinely rejected noisy components with a total compound variance of <1% (i.e., always keeping 99% of the original LFP variance), unless their spatial and temporal accuracy can be ensured through other means. For example, priming LFPs with CA3-evoked activity (Korovaichuk et al. 2010) and/or selecting recording channels that maximize spatial differences of the sources of interest can improve the separation of weak components (Benito et al. 2014).

The spatial stability of LFP generators within and across animals was estimated using cluster analysis of spatial curves as in Makarov et al. (2010), whereas their landmarks (e.g., maxima or zero crossings) were matched to anatomical boundaries using electrophysiological correlates (unit firing at cell body layers and EP and CSD profiles) and histological verification (Benito et al. 2014). Conveniently, each LFP generator has a single spatial profile independent of the duration of the epoch, and the momentary spatial distortions introduced by unbalanced tangential currents are effectively canceled by time averaging of myriads microscopic currents as if they all were synchronously activated (Makarova et al. 2011). Thus, the curve of spatial weights for each LFP generator is accurate to the subcellular level in monolayered structures, whereas it is less relevant in glomerular structures like the LS where it reproduces the joint field distribution of the synaptically activated population (Makarova et al. 2014).

The efficiency of ICA to accurately extract LFP generators depends on their relative contribution to the LFP signal (Makarova et al. 2011). Therefore, when dealing with modeled LFPs, we

first adjusted the variance of known LFP generators to realistic values (e.g., the Schaffer input ~3–5% of the total variance [Korovaichuk et al. 2010]; note that the relative variance can be increased by selecting a suitable subset of the recording sites [Benito et al. 2014]). This was achieved by adding several fake channels to the model simulating recordings of LFPs with uncorrelated activity, thereby balancing the required amount of variance in targeted LFP generators. The efficiency of separating weak generators in model and experimental recordings was thus similar, which allowed some anatomical projections to be studied that apparently had no sizable contribution to LFPs.

Data Analysis Strategy

We analyzed only LFP epochs displaying large-amplitude irregular activity, that is, the “LIA” functional state exhibiting a broad frequency spectrum (0.5–25.0 Hz). Theta epochs were excluded except when indicated. We applied the ICA approach and separated LFPs produced by the CA3 input in all target regions. In cases of strong co-variation of 2 different pathways, such as the ipsi- and contralateral CA3 inputs, the ICA may return 1 LFP generator that contains a mixture of 2 components (Makarova et al. 2011). To quantify the efficiency of the ICA in this case, we used model LFPs and evaluated the cross-correlation (CC) of an a priori known generator (obtained for a single input) and the ICA-derived components from the mixture. Thus, the CC measured the temporal accuracy of the original and retrieved signals.

The time evolution of the power of an LFP generator (in mV²) was calculated by:

$$P(t) = \int H(t - \tau) v^2(\tau) d\tau, H(x) = \begin{cases} 1/\Delta & \text{if } x \in [-\Delta/2, \Delta/2] \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases},$$

where $v(t)$ is the virtual LFP at the electrode with maximal power and Δ is the length of averaging. The overall mean power is then defined by setting Δ equal to the complete time interval (200 and 2 s for experimental and simulated LFPs, respectively).

We estimated the periodogram power spectral density of the temporal activation of real and model LFP generators (power spectra) and then computed the signal power in different frequency bands (in Hz): 0.5–13 (δ – θ), 13–10 (β), 30–50 (low- γ), 50–80 (high- γ), 80–110, and 110–130.

The CA3 sends excitatory gamma packages, and the postsynaptic gamma waves may differ somewhat in each target region according to the specific topology of the connections. In a subset of the experiments, we compared the amplitude of gamma waves in different structures, retrieving and quantifying the individual waves from the time activation $s(t)$ of the corresponding (CA3) LFP generator as described elsewhere (Fernández-Ruiz et al. 2012a). Briefly, the signal $s(t)$ is processed by the continuous wavelet transform using the Haar wavelet as a template to detect short pulses in the signal. Analyzing the time course of the corresponding LFP generator in the wavelet space, we can identify separate gamma waves and find their amplitudes, durations and time instants (e.g., Martín-Vázquez et al. 2013).

As we will see below, CA3-elicited input in some targets may be too small. Therefore, we used the timings of gamma waves detected in the CA1 to average spatial and temporal LFP profiles in other targets, thus revealing their spatial and temporal characteristics. Averages were typically built for epochs lasting at least 10 min (>3000 waves).

The spectral coherence of the activity of 2 model LFPs obtained from aggregates built with model neurons of different

morphology was calculated by:

$$C_{xy}(f) = \frac{|P_{xy}(f)|^2}{P_{xx}(f)P_{yy}(f)},$$

where $\{P_{ij}(f)\}$ is the matrix of cross-power spectral density. To determine the level of significance, we used the surrogate data test (Schreiber and Schmitz 2000). Randomizing phase relations and keeping other first-order characteristics intact, we obtained surrogate time series from the original signals. For each experiment, we generated 1000 surrogates and we evaluated spectral coherence. The significance level (at $\alpha = 0.05$) was then calculated for each frequency value and coherence above this level was considered statistically significant.

We also evaluated the probability distribution histograms (PDHs) of the phase difference between time activations of 2 LFP generators $\Delta\phi(t) = \phi_2(t) - \phi_1(t)$, corresponding to different pathways. For proper estimation of the activation phase $\phi_n(t)$, we used down sampling of $s_n(t)$ followed by band-pass filtering in the range 20–60 Hz (the CA3 activity evokes gamma waves: Fernández-Ruiz et al. 2012a). The signal obtained was passed through the Hilbert transform, yielding the phase $\Delta\phi_n(t)$. Using $\Delta\phi(t)$, we calculated the phase-locked value (PLV) between generators (Lachaux et al. 1999):

$$PLV = \left| \frac{1}{T} \int_0^T e^{i\Delta\phi(t)} dt \right|.$$

The PLV attains a value of 1 if, and only if, the signals are phase-locked (synchronized), whereas $PLV \rightarrow 0$ if the signals are uncorrelated. To examine the statistical significance of the PDH and PLV, we adopted a surrogate data test. The surrogate time series were obtained from the original signals by randomizing the phase relationships and keeping the other first-order characteristics intact, identifying a 95% confidence interval from the surrogate distribution. For PDH, we used the Bonferroni correction to avoid the growth of false positives. If the PDH or PLV value exceeded the critical confidence limit, then we decided positively on the presence of phase coupling between LFP generators. In this case, the maximum PDH was also used to evaluate the phase lag between 2 LFP generators.

Results

In this study, we first set out to define the main features of CA3-originated EPs and ongoing LFP generators in each target region. Subsequently, we compared the EPs and LFP generators found, and we considered the relevant factors and mechanisms responsible for the differences observed. Since the anatomical and functional features of each target region dictate the methodology that can be applied, the results were presented comparing different structures only when possible.

Spontaneous Activity in CA3 Produces Strong or Vanishing LFPs in Different Targets

We assessed direct functional CA3 input to the CA1 in both hippocampal lobes by electrical activation of the CA3b, as well as that to the ipsilateral LS, using a stimulus intensity that remained subthreshold for the CA1, that is, it did not evoke population spikes (80–150 μ A). The potentials evoked by the ipsi- and contralateral CA3 inputs to the CA1 were fEPSPs with a stereotypic spatial distribution and amplitude, and a negative fEPSP/spike

complex termed N_{1-2} in the LS (Fig. 1B and Materials and Methods). The onset latencies for the Schaffer, Commissural, and Septal responses were 2.8 ± 0.1 , 7.1 ± 0.2 and 7.5 ± 0.4 ms, respectively (mean \pm s.e.m.; $n = 14, 9, 5$ animals), and all 3 responses followed repetitive stimulation (5–10 Hz) and they were therefore considered to be monosynaptic. The Schaffer and Commissural fEPSPs lasted significantly longer than the N_1 LS response (Sch, 18.5 ± 0.6 ms [$n = 14$]; Comm, 14.6 ± 0.7 ms [$n = 9$]; N_1 , 10.8 ± 0.5 [$n = 5$]) according to a one-way analysis of variances of the 3 means. Similarly, pair-wise comparisons among them also showed statistically significant differences between all pairs ($P < 0.001$, Student t-Test). At comparable intensities, the fEPSP amplitude was much higher in the CA1 relative to the LS. For instance, at the intensity just below threshold, the amplitude was 8.5 ± 0.4 , 4.7 ± 0.4 and 0.15 ± 0.04 mV for the Schaffer, Commissural, and LS responses, respectively, a proportion of 57:31:1. However, the relative duration and amplitude of EPs are not reliable indices for the underlying synaptic currents. In particular, the excitatory current sink (sk1) of the LS response strongly overlaps with spike and di-synaptic currents (see Supplementary Fig. 2 and below). Notably, the presence of a large spike component (N_2) and a delayed presumably di-synaptic inhibition at low stimulus intensity indicates a much lower threshold of CA3-driven interneurons in the LS than that in CA1 pyramidal neurons.

In light of that mentioned above, we investigated the spontaneous activity by first estimating the mean power and spatial distribution of raw (multiorigin) LFPs in the CA1 and LS (CA3 recurrent LFPs are studied separately below). In an epoch of raw LFPs along the main neuron axis in the CA1, the power is strongly layer dependent, increasing steeply from 0.047 ± 0.017 mV² in the st. oriens (range: 0.005 – 0.174 mV², estimated in 10-min epochs; $n = 11$ animals) to 0.22 ± 0.03 mV² in the st. lacunosum-moleculare (L-M) near the hippocampal fissure (range: 0.09 – 0.36 mV²; Fig. 2A1). LFPs in the LS were much smaller and homogeneous (Fig. 2B1) with the mean 0.01 ± 0.004 mV² ($n = 4$ animals; range 0.007 – 0.014 mV²). Thus, we get a maximum CA1-to-LS ratio of 20:1. However, multiple local and remote sources may cancel each other out in the resulting raw LFPs (Martín-Vázquez et al. 2013). Thus, the contribution of a particular afferent population to different targets can only be safely estimated by isolating its specific activity. To assess this activity, we used an ICA-based disentanglement of pathway-specific contributions to LFPs (see Materials and Methods), an approach that yielded 2 significant LFP generators in the CA1 with a bell-shaped spatial distribution centered in the st. radiatum and L-M, respectively (V_{wt} in Fig. 1C). Different animals showed LFP generators with identical spatial distribution (Fig. 2A1, V_{wt} thin dashed curves aligned by the st. radiatum maxima, $n = 13$; their averages are shown in thick solid lines, mean \pm s.e.m.). Earlier we identified these generators as the CA3 excitatory input (labeled Sch) and a mixed excitatory/inhibitory component (labeled L-M) in the st. L-M (Benito et al. 2014). Moreover, an additional weak component corresponding to perisomatic inhibition contributes residually to LFPs in the CA1 (not shown) and its isolation required additional data analysis.

Surprisingly, we could never separate Schaffer and Commissural LFP components in a single animal and epoch. Therefore, the st. radiatum component (Fig. 2A1, black) could in principle correspond to a mixture of both the ipsi- and contralateral CA3-CA1 pathways that have similar (but not identical) synaptic domains. Note that the spatial profile of the found pathway-specific LFPs shall match that of the EPs if the stimulated pathway has ongoing activity in the recorded period. To discriminate between a uni- or bilateral contribution, we compared the spatial profile of

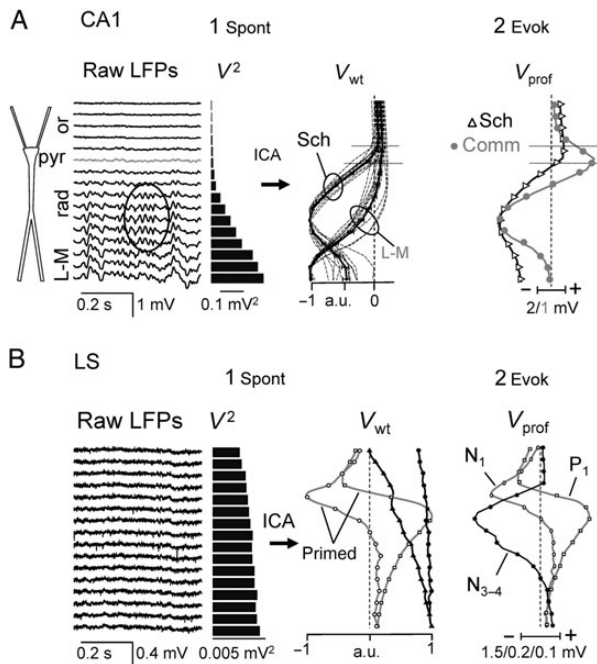


Figure 2. Spatial features of CA3-elicited spontaneous and evoked activity in the ipsi- and contralateral CA1 regions (A), and in the LS (B). (A) Raw LFP profiles in the CA1 show a characteristic gradient of increasing variance (V^2) toward the distal apical dendrites. The ICA yielded 2 partially overlapped components (V_{wt}) centered on the mid (Sch group) and distal apical dendrites of the CA1 neurons (L-M group). Thirteen superimposed spatial profiles (thin dashed traces) superimposed on each group belong to different animals, and the mean \pm s.e.m. is plotted in the thick traces. Horizontal lines mark the soma layer. (2) Spatial profile of subthreshold ipsi- (Schaffer, in black) and contralateral (Commissural, in gray) CA3-evoked potentials (V_{prof}). Note the similarity of spontaneous and Sch-evoked spatial profiles, whereas the Commissural EP has no spontaneous counterpart. (B) Raw LFPs in the LS (1) are smaller and “noisier.” The ICA revealed 2 spatial components with near-flat profiles (black curves) accounting for most of the variance. Curves without local maxima indicate remote activity. The ICA components capture spontaneous as well as evoked activity in a pathway. Thus, only when the septal LFPs contained CA3-evoked activity did 2 additional weak components appear (“primed”) with local maxima that have identical profiles to the N_1 and P_1 waves in CA3-EPs (2). Upon increasing stimulus intensity, additional components of the EP appeared that prompted a new ICA component with spatial distribution matching that of the N_{3-4} wave. All these primed components contributed $<1\%$ of total variance. or, st. oriens; pyr, st. pyramidal; rad, st. radiatum; L-M, st. lacunosum-moleculare. Except for Panel A1, all other panels are sample experiments. For population statistics, see the main text.

the components extracted from CA1 LFPs to those of the ipsi- and contralateral CA3-evoked fEPSPs. Accordingly, it became evident that the LFP component centered on the st. radiatum and the ipsilateral (Schaffer) evoked profiles were nearly identical (Fig. 2A1, A2, black curves), whereas both clearly differed from the contralateral evoked fEPSP (Comm in Fig. 2A2, gray curve). Such spatial correspondence suggested a dominant contribution by the ipsilateral CA3 pyramidal cells via Schaffer collaterals, whereas the absence of a separate Commissural input in LFPs is puzzling and was investigated further (see below).

In the LS, we found 2 strong LFP components that exhibit roughly linear distributions in all animals (Fig. 2B1, black curves, $n = 4$). Such spatial configuration indicates a remote origin of the sources, and thus, they were labeled as LS_{rem1} and LS_{rem2} . Together, the extrinsic components accounted for 94–97% of the total LFP variance, leaving little margin for local contributions. In fact, we were only able to identify 2 additional LFP

components, with $<1\%$ of variance, in some epochs that contained abundant sharp waves (SPWs) or CA3-evoked potentials (primed LFPs). The spatial profiles of the new components matched the N_1 and P_1 waves of the CA3-evoked LS response (compare gray curves in Fig. 2B1, B2), confirming both their local origin and their negligible contribution to raw LFPs. Thus, the quantitative comparison of relatively weak and experimentally unstable CA3-LS LFPs with well-isolated CA3-CA1 LFPs requires assistance by modeling (see below).

ICA-separated LFP components preserve the same time resolution as the original signals (Stone et al. 2002; Makarova et al. 2011) and can thus be used to reveal detailed temporal features of some particular CA3-induced LFP events in different targets. Three types of CA3-originated events involving different degrees and modes of afferent synchronization were resolved (Fig. 3A, left 3 columns): i) evoked fEPSPs, ii) SPWs, and iii) baseline activity composed by uneven excitatory gamma waves (Fernández-Ruiz et al. 2012a; Benito et al. 2014). For each type, the most prominent events were observed in the CA1. In the LS, the evoked fEPSPs and spontaneous SPWs were clearly visible in mono- (LS_{N1}) and disynaptic (LS_{P1}) LFP components, albeit much smaller than that in CA1 (note the different scales in Fig. 3A). Gamma waves were apparently buried by the noise in the LS, although they could be retrieved by massive trace averaging using the time of initiation of the individual waves detected in the CA1 as a trigger (Fig. 3A, γ -Avg). One of the LFP components of remote origin in the LS (LS_{rem1}) displayed irregular fast activity with epochs reminiscent of cortical slow oscillations, and the other (LS_{rem2}) showed small amplitude theta upon tail pinch that matched activity in the L-M hippocampal generator and hence it is likely volume-conducted from that region (Fig. 3A, theta, arrow). The CA1 L-M component exhibited slow but strong irregular activity, with interspersed bouts of gamma waves, and it was the only LFP component that displayed theta rhythm in the CA1 region. When the mean power of LFP components was estimated in reconstructed CA3-specific LFPs at the site of maximum amplitude (Fig. 3B), the contribution of the CA3 to LFPs was seen to be ~ 100 times stronger in the ipsilateral CA1 than that in the LS. For reference, the L-M component in CA1 was ~ 3 times stronger (0.045 ± 0.009 vs. 0.014 ± 0.003 mV², respectively), whereas the remote components in the LS had 2–7 times less power, although they were still dominant there.

Morphology and Arrangement of Neurons in Different Targets Explain LFP Scales

The data presented above indicated that the same CA3 input produces large LFPs in the ipsilateral CA1, whereas their amplitude is very small in the LS, a difference we set out to explore. Since the excitatory input pattern can be considered common to all target populations, the morphology and spatial organization of the target regions are the variables that most likely explain the difference in amplitude. These factors are difficult to assess experimentally but they can be tested using realistic modeling of multicellular aggregates (Makarova et al. 2011; Fernández-Ruiz et al. 2013). Using abundant cytoarchitectonic data, we have developed and thoroughly tested a model of the CA1 (see, e.g., Martín-Vázquez et al. 2013), and set a new model for the LS (see Materials and Methods).

In these models, we assessed pyramidal-like neurons for the CA1 and interneuron-like cells for the LS, arranging the cells in a palisade and scattered distribution for the CA1 and LS, respectively (Fig. 4A, B, left panels). To mimic the common drive through axon branches of CA3 pyramidal cells, both aggregates were

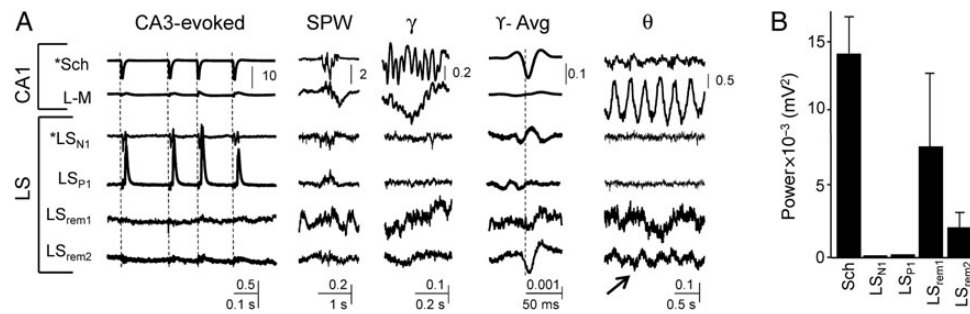


Figure 3. Patterns of activity in all LFP components found in the CA1 and LS. (A) From left to right: sample epochs containing 4 CA3-elicited events (evoked potentials, sharp waves [SPWs], baseline gamma activity, averaged gamma wave [γ -Avg, $n = 1600$ events]), and theta oscillations. Asterisks in Sch and LS_{N1} components mark CA3 monosynaptic origin. LS_{rem1,2}: remote components volume-conducted to the LS from regions out of recording sites. SPWs in the CA1 were mirrored by SPWs of smaller amplitude in the excitatory (LS_{N1}) and inhibitory (LS_{P1}) septal components. Baseline gamma activity is too small in the LS, but their presence is revealed by averaging using CA1 waves for timing. Note the different vertical calibration (in mV) for the CA1 and LS. (B) Mean power (mean \pm s.e.m) of separated LFP components ($n = 11$ animals for Schaffer and $n = 4$ for all others).

excited with identical excitatory gamma sequences obtained from real experiments prior to simulating CA3-induced LFPs in both aggregates (middle panels). The mean LFP amplitude in the CA1 was at least 26 times larger than that in the LS (Fig. 4C, arrows), consistent with the experimental observations. We tested how the LFP amplitude depends on the size of neural aggregates (Fig. 4C). In the LS, the mean amplitude ranged from 3.5 to 30 μ V for sizes from 1 to 7 mm³, values that as expected were far below the observed contributions of (remote) sources recorded in the LS. However, the CA1-to-LS amplitude ratio was proportional for aggregates of equivalent size and cell density.

To explore how much of the regional difference is due to neuron morphology or to the local spatial arrangement of the cells, we ran least-optimal simulations by transposing the cytoarchitectonic configurations, obtaining calculations from the CA1 model with scattered (though still aligned) pyramidal cells and from the LS model built as a single layer of aligned interneurons. Even in this case the scattered pyramidal cells still produced LFPs that were 9.4 times larger than those of the aligned LS interneurons (Fig. 4C, arrowheads). Also, different spatial configurations of the dendrites in septal model units were explored (Supplementary Fig. 3) that yielded larger and smaller LFPs for maximally axialized and radial outlines, respectively (maximum power ratio was 7.6). Finally, since the 2 model cells preserve a certain axial morphology that is prone to LFP production, we checked an additional imaginary neuron model with a polarized morphology and intermediate dendritic surface (see Materials and Methods). When activated with identical inputs, the corresponding aggregate model produced LFPs of intermediate amplitude (dashed bars and green curve in Fig. 4C, D), emphasizing the essential role of the target neurons' morphology. Overall, it comes out that the strong amplitude difference between CA1 and LS targets arises not only from the smaller net amount of current injected to the extracellular space by the smaller septal neurons but from the population's configuration. Thus, the layered arrangement of CA1 pyramidal cells promotes the clustering of currents of the same polarity hence the buildup of a strong macroscopic dipole (Fig. 4A, right panel), whereas inward and outward currents injected by cell elements of disordered septal interneurons cancel each other (Fig. 4B, right panel). A dynamic view of this effect can be better appreciated in Supplementary movies M1–M2 made for small cell aggregates.

It is worth mentioning that although both cell types were activated with identical input series made of excitatory gamma quanta of varying amplitude, the LFPs obtained in the CA1 and LS showed consistent temporal differences (Fig. 4E shows

superimposed scaled traces of CA3-elicited model LFPs in the CA1 and LS). Notably, the duration and phase between CA1 and LS gamma waves varied in different targets according to the strength of the input. Thus, gamma waves elicited by small afferent quanta showed similar temporal features in CA1 and LS, whereas waves elicited by stronger quanta were shorter in the LS and they were out-phased. Such differences are explained by the different dynamics of intracellular depolarizing potentials that modulate amplitude and duration of transmembrane currents. The differences in individual gamma waves were also scaled up in the macroscopic spectral features of the LFPs. The smaller interneuron-like LS neurons shaped LFPs with higher-frequency content than CA1 LFPs (Fig. 4E, lower panels). This effect introduces notable distortion when estimating the spectral coherence between the LFPs in both target regions. The extent and frequency band showing discrepant coherence was largely dependent on the input parameters. We did not explore this issue parametrically (a sample spectrum is shown in Fig. 4F for an epoch with mean input frequency of 40 Hz that displays reduced coherence in the high-gamma frequency band). Globally, these results indicate that different spatiotemporal summation of synaptic currents by morpho-electrotonic differences of target neurons strongly modulated micro- and macroscopic LFP features.

Temporary Inactivation of the Contralateral CA3 does not Reveal a Commissural Contribution to CA1 LFPs

Although both Schaffer and Commissural axon collaterals contact similar dendritic domains of the same neurons, it was not clear why the contralateral CA3 input to CA1 is not present in LFPs. Thus, to assess the possible Commissural contribution, we compared the CA3-related component obtained from CA1 LFPs in the left and right hippocampus after temporary inactivation of the CA3 in the left side through the local injection of the anesthetic lidocaine (Fig. 5A). In these studies, by recording at homotopic sites, we optimized the density of the interhippocampal connections (Finnerty and Jefferys 1993). The effect of lidocaine injection on the EPs elicited by stimulation of each side was studied (Fig. 5B), and we observed the selective depression of evoked responses elicited from the left CA3, the side of drug injection (CA3_L-CA1_L and CA3_L-CA1_R, gray traces). Note that the CA3_R-CA1_R response shows negligible variation (i.e., no effect of the contralateral suppression). We also monitored the amplitude of CA3_R-CA1_L to ensure that there was no diffusion of the drug into the CA1 that would affect the transmission in Schaffer collaterals (arrowhead in Fig. 5B; population data in Fig. 5E).

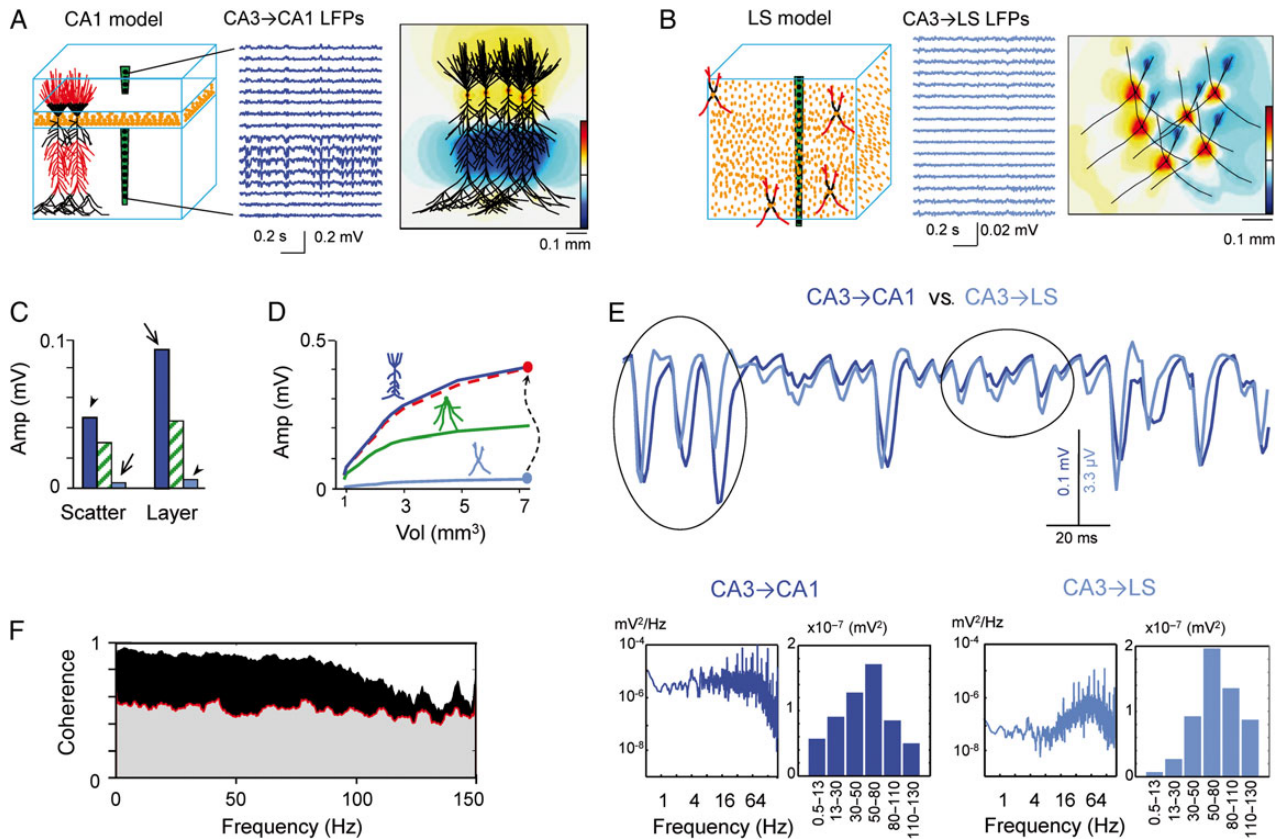


Figure 4. The cytoarchitecture and morphoelectronic features of CA3-targeted neurons in the CA1 and LS explain the observed amplitude of LFPs. (A,B) Multineuronal realistic models of the CA1 and LS (left panels). CA1 pyramidal neurons and LS interneuron-like cells are arranged in a layered or a scattered manner, respectively (orange dots represent the position of cell somata). Middle panels: LFPs calculated for identical gamma-patterned excitatory inputs to the apical and basal dendrites (red compartments in cell dummies) were ~20 times larger in the CA1. Note the dominance of negative polarity in CA1 apical dendrites despite the strong basal co-activation. Right panels: snapshot of isopotential contours recreated for small cell aggregates in an XY zero plane. The spatial clustering of inward and outward currents in the orderly CA1 population builds up a strong macroscopic dipole, whereas currents mix and cancel in the scattered arrangement of the LS model give rise to smaller LFPs. Blue and yellow/red contours correspond to negative and positive polarity, respectively (color bar: ± 0.2 mV and ± 4 μ V). See also [Supplementary movies M1–M2](#). (C) Mean amplitude of LFPs in the CA1 (blue bars) and LS (cyan bars) models using realistic cytoarchitectures (arrows) compared with the least-optimum case by switching cell types (arrowheads). The reduction in amplitude differences quantifies the separate effects of cell morphology and cell arrangement. Hatched bars correspond to additional simulations using a fake cell type with a polarized morphology and intermediate surface (granule cell like). (D) The plots represent the mean LFP amplitude for increasing aggregate size. The CA1-to-LS amplitude ratio remains proportional regardless of the aggregate size (plotted as the red dashed line and normalized to CA1's by the maximum values: end-dots). Green trace belongs to the imaginary aggregate of granule cells. (E) Amplification of an LFP epoch to a similar visual scale to show the temporal detail of the LFPs. The input series were identical for the CA1 and LS aggregates. Small afferent quanta produced gamma waves with similar dynamics, but larger quanta produced waves of different duration and phase (compare ovals). Lower panels (left: power spectra; right: cumulative power in predefined frequency bands) show increased content of higher frequencies in the LFPs caused by macroscopic scaling of the different intracellular summation of synaptic currents in CA1 pyramidal cells or the smaller LS interneurons. (F) Spectral coherence between model LFP in CA1 and the LS activated with the same temporal gamma pattern (variable quanta at 45 Hz mean rate). The black surface represents the statistically significant coherence (surrogate test). Note a strong reduction of coherence in the high-gamma band.

The LFP amplitude in the left CA1 decreased immediately upon microinjection of lidocaine into the ipsilateral CA3_L, whereas LFPs in the contralateral side remained intact (Fig. 5C, Inj 1). Even large (0.4–0.6 μ L) or multiple injections that completely abolished LFPs in the left CA1 (possibly by drug expansion, since L-M components were also depressed) were ineffective in reducing LFPs in the right CA1 (Inj 2). Control injections of equivalent volume of saline did not noticeably modify the CA1 LFPs on either side ($n = 3$ animals). Since the mean amplitude of raw LFPs is not necessarily related to the contribution of any of the co-activated pathways in isolation, due to intracellular mixing and/or extracellular contributions by remote sources (e.g., the LS), we also quantified the mean variance of the ICA-isolated LFP components. The power of the left and right LFP components was assessed (Fig. 5D; insets show examples of activation exhibiting gamma waves). Again, only the ipsilateral component

was dampened by lidocaine injection (0.27 ± 0.02 vs. 0.93 ± 0.1 mV²; $P < 0.01$, Student *t*-Test; see Fig. 5E for a summary of the population data [$n = 5$ animals]).

These observations support the hypothesis (see also Fig. 2A and the corresponding section) that most of the variance in the CA1 st. radiatum ICA component can be explained by the ipsilateral CA3 pathway alone, whereas contralateral input plays only a minor role in LFP generation.

Afferent Synchronization: Spontaneous CA3-Originated Excitatory Gamma Events are Only Visible in the Ipsilateral CA1

The ipsi- and contralateral CA3 inputs converge on pyramidal cells of each CA1. Although the ongoing contralateral contribution is hardly appreciable in CA1 LFPs, it may exert an essential

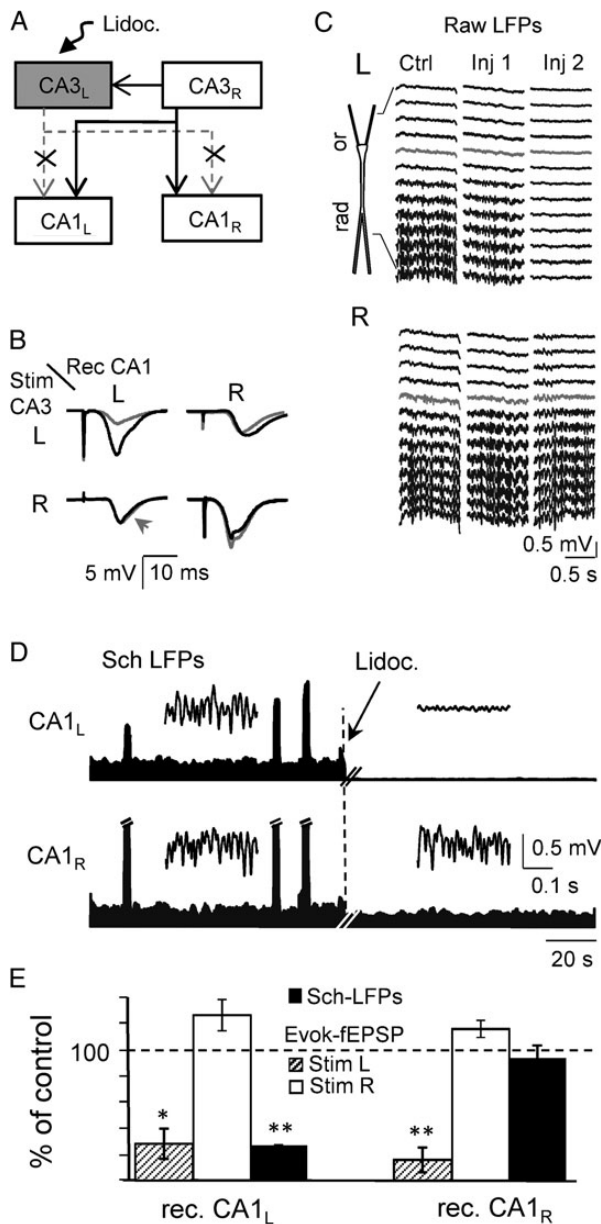


Figure 5. Suppression of CA3 activity in one side of the hippocampus does not disclose a contralateral CA3 contribution to CA1 LFPs. (A) Lidocaine injection in the left CA3 isolates the ipsilateral CA3-to-CA1 projection to the right hippocampus. (B) Mean EPs ($n=6$ stimuli) recorded in the st. radiatum of left and right CA1 upon stimulation of the left or right CA3, before (black traces) and after (gray) lidocaine administration to the left CA3. Note the selective reduction of EPs when driven from the left side. (C) The effect of 2 lidocaine injections (*inj*) separated by 5 min on raw LFPs across the CA1 in both hippocampi. CA1 LFPs were selectively suppressed on the left side leaving the contralateral CA1 LFPs unaffected. (D) Representative experiment showing the time envelopes of the mean power (sliding window of 0.5 s) at the site of maximum activity in the st. radiatum, components of CA1 LFPs separated by the ICA in both hippocampi. Lidocaine was injected into the left CA3 at the dashed vertical line. Large peaks correspond to SPWs (truncated). Insets are fragments of the baseline gamma activity. Pre- and postlidocaine LFP fragments were analyzed together to ensure the presence of ICA components that were active before treatment. Panels B, C, and D correspond to sample experiments, and the population data are plotted in (E): Pooled data of the evoked fEPSP and spontaneous Schaffer-LFPs in both hippocampi following lidocaine administration to the left CA3 (as percentage of the control): * $P < 0.01$; ** $P < 0.005$, Student t-Test.

excitatory contribution to individual neurons. Conveniently, its time course can be obtained from the ipsilateral contribution in the other side. Thus, we explored whether spontaneous CA3-CA1 individual excitatory gamma waves composing the Schaffer LFP generator (interpreted as spontaneous micro-field-EPSPs: Fernández-Ruiz et al. 2012a) were synchronized in both hippocampi using 2 linear probes situated at homotopic sites of the CA1 (see a representative example of CA3-originated gamma waves in the left and right CA1 in Fig. 6A). Most waves occur synchronously on both sides, referred to as paired or bilateral waves, although a sizable fraction of events were unilateral (Fig. 6A, arrows). We identified $5.5 \pm 1\%$ and $11.7 \pm 2.4\%$ of unilateral events in the left and right CA1, respectively ($n=5$ animals), and these unilateral events were 32% (left) and 35% (right) smaller than the bilateral ones. The greater size of the bilateral (synchronous) waves may be due to a surplus reciprocal contribution from the contralateral CA3, but it may also be caused by a reduced excitatory drive to CA3 pyramidal cells in both sides that remained subthreshold (no output to CA1) in 1 CA3. Thus, we explored this issue further by comparing spontaneous CA3-CA1 gamma waves to exogenously activated CA3 fEPSPs obtained with low stimulus intensities.

If we consider fEPSPs evoked with minimal intensity (Fig. 6A, triangles), the amplitude and shape are close to the characteristics of spontaneous gamma waves except that they appear in the ipsi- but not the contralateral side and thus, we can consider them similar to spontaneous unilateral events. By spanning stimulus intensities, we found a range in which contralateral evoked fEPSPs were undetectable whereas the ipsilateral evoked fEPSPs already had amplitude comparable to the spontaneous gamma waves (Fig. 6B). Above this range, contralateral evoked fEPSPs appeared, although at all stimulus intensities, they were smaller than the ipsilateral events (Fig. 6C shows the complete I/O curves). The threshold to obtain measurable contralateral responses was $10.8 \pm 1.6 \mu\text{A}$ higher than the ipsilateral one ($n=8$; Fig. 6D). These data indicate that the activation of a reduced artificial cluster of CA3 pyramidal cells (those near the stimulating electrode) provokes visible LFPs in the ipsilateral but not in the contralateral homotopic CA1 region. Only when the cluster becomes artificially larger were contralateral LFP gamma waves evident. This suggests that bilateral CA3 synchronization occurs naturally, probably due to mutual bilateral driving of CA3 assemblies, which is then transmitted to the CA1 in the form of paired gamma waves. Thus, unilateral gamma events may correspond to occasional subthreshold driving of CA3 pyramidal cells.

Dominant Contribution of CA1 Apical Dendrites to LFPs Fades Contralateral and Favors Ipsilateral CA3 Inputs

An intriguing experimental observation was that both spontaneous and evoked LFPs elicited by the CA3 in the CA1 produce negative potentials in the apical but not in the basal dendrites, even though CA3 axon collaterals terminate on both of them. We explored this issue using the model as it may bear relevance for the spatial matching of LFPs to their sources when contributed by highly synchronous inputs with an extensive overlap of synaptic domains.

We first studied a realistic configuration of the synaptic contacts in basal and apical distributions as reported in anatomical studies (Shinohara et al. 2012). To model the ipsi- and contralateral CA3 inputs, we used a nearly synchronous bilateral

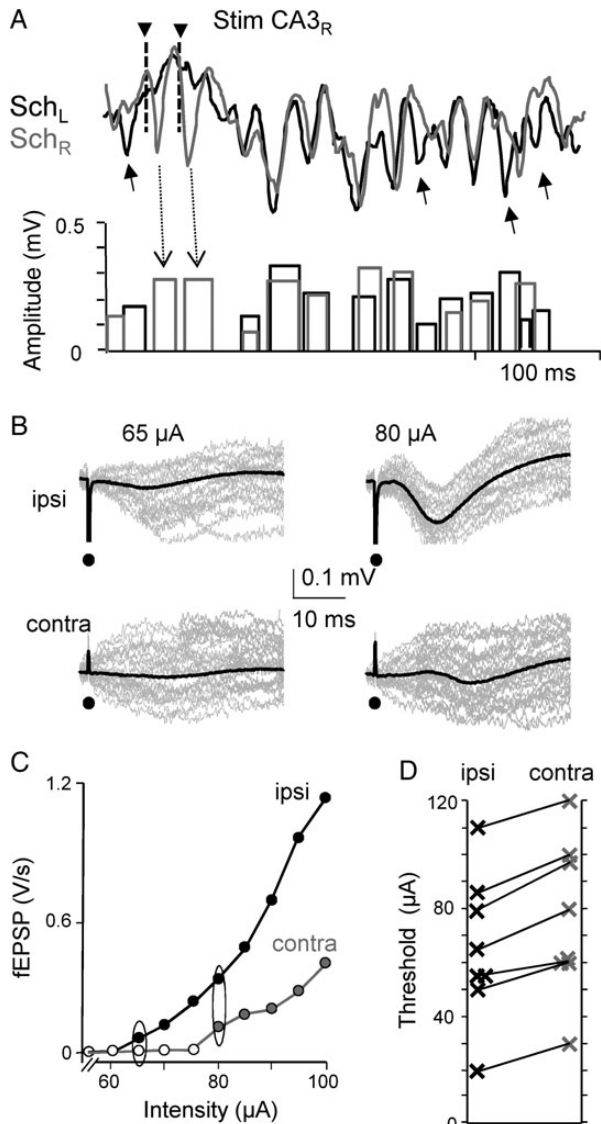


Figure 6. Spontaneous or evoked CA3-CA1 baseline gamma waves can only be appreciated ipsilaterally. (A) Gamma waves in the left and right CA1 (top traces) are identified by the Haar wavelet analysis (bottom bars). The bar height and width correspond to the amplitude and duration of the event, respectively. Most events were paired (synchronized) in the left and right CA1, but some appeared on only one side (arrows). CA3 stimuli on the right side (triangles) delivered at threshold intensity produced small fEPSPs on the right but not on the left side. Their amplitude is equivalent to spontaneous gamma waves. The panel corresponds to a sample experiment: population statistics is in the main text. (B) Responses (averaged in black and 30 raw potentials in gray) to stimuli in one side of the CA3 recorded from both sides of the CA1 in a sample experiment. (C,D) input/output curves in a representative experiment and pooled data ($n=8$ animals) to estimate the ipsi- and contralateral threshold intensities (ovals in C) for fEPSPs obtained in both CA1 (each dot averaged 60 responses, mean \pm s.e.m.).

excitation with 45-Hz mean frequency through series of excitatory packages each of uneven amplitude that was randomly assigned in the sequence (Fig. 6A). The relative strength and spatial extent of the synaptic domains is depicted in Figure 7A (rectangles), and the apical-to-basal excitation ratio was set to 4.5:1 and 1:2 for the ipsi- and the contralateral inputs, respectively.

When the ipsilateral input was considered alone, LFPs were produced with a bipolar spatial profile that presented a large negative hump in the st. radiatum and reversed to a positive

potential below the cell body layer and through the basal dendrites (Fig. 7A, blue curve). This occurred despite the fact that selective activation of the st. oriens fibers produced a local negative potential (dashed blue curve). Accordingly, the contralateral input alone rendered LFPs with an all-negative distribution along the cell axis, and with 2 minima in the basal and apical dendrites (Fig. 7A, red curve). We then tested different configurations of the contralateral input and found that the observed bipolar distribution is quite stable, remaining qualitatively intact for a large range of total input strength and apical-to-basal relative densities. Modifying the spatial orientation of basal dendrites from the standard fan-like configuration to a parallel all-vertical arrangement neither produced significant change of the spatial profile. Despite receiving half the density of excitatory currents of basal dendrites, the apical dendrites generate stronger LFPs and thus, the predominant contribution of apical dendrites is explained by their more axialized structure and the higher density of excitatory currents in the apical shaft. Such dominance also prompted the 3-fold increase in LFP size for the ipsi- rather than the contralateral input.

We then ran simulations by combining both inputs, which still rendered a bipolar joint spatial LFP profile strikingly similar to that produced by the ipsilateral input alone (Fig. 7A, black curve). This agrees with experimental observations of the predominant ipsilateral CA3 contribution to CA1 st. radiatum LFPs (see Fig. 2A). However, it does not explain why the contralateral EPs are not all-negative in experiments. Neither explains the reduced positivity in the somato-basal band, often negligible in the small amplitude raw gamma waves centered in the st. radiatum of CA1. These 2 features are investigated below.

In addition, we tested the ICA efficacy for disentanglement of combinations of rhythmic synaptic sources with extensive spatiotemporal overlap, an extreme case where the algorithms may render poor results (Makarova et al. 2011). We ran multiple simulations to obtain model LFPs using a variable relative density of synaptic conductance (0.5:1 to 2:1, basal-to-apical ratio) and delays between the inputs (from 0 to 10 ms). We assayed the ICA on the model LFPs using a realistic total variance of the Schaffer and Commissural LFPs set at 4% and 1%, respectively (see Materials and Methods). Globally, the results (Supplementary Fig. 4) can be summarized as follows: the separation and temporal fidelity of the ICA-retrieved sources depended on the absolute and relative variance contributed by each pathway, and on their temporal dissimilarity (phase difference and phase jitter favors efficacy). When the temporal accuracy (measured in terms of CC, see Materials and Methods) of extracted components for a progressively growing delay between ipsi- and contralateral inputs was measured the ipsi- and contralateral sources cannot be separated for delays shorter than 2 ms. However, the apical dominance and its important impact on the Schaffer rather than the Commissural configurations led to a quite robust CC between the original and the ICA-retrieved Schaffer inputs. In contrast, the Commissural input was less reliable and may even remain buried or disintegrated into noisy components.

From these results, we infer that even if a synchronous contralateral CA3 input might have gone undisclosed by the ICA, the dominance of apical currents on LFP production favors the occlusion of the weaker contralateral input and hence, the st. radiatum LFP component in CA1 can be safely taken as an ipsilateral CA3 (Schaffer) readout.

Volume-Conducted Currents from Concurrent Gamma Waves in Nearby Regions Modify Local Profiles

Thus far, we have used CA1-only model aggregates to reproduce the LFPs generated by the local currents upon input from the

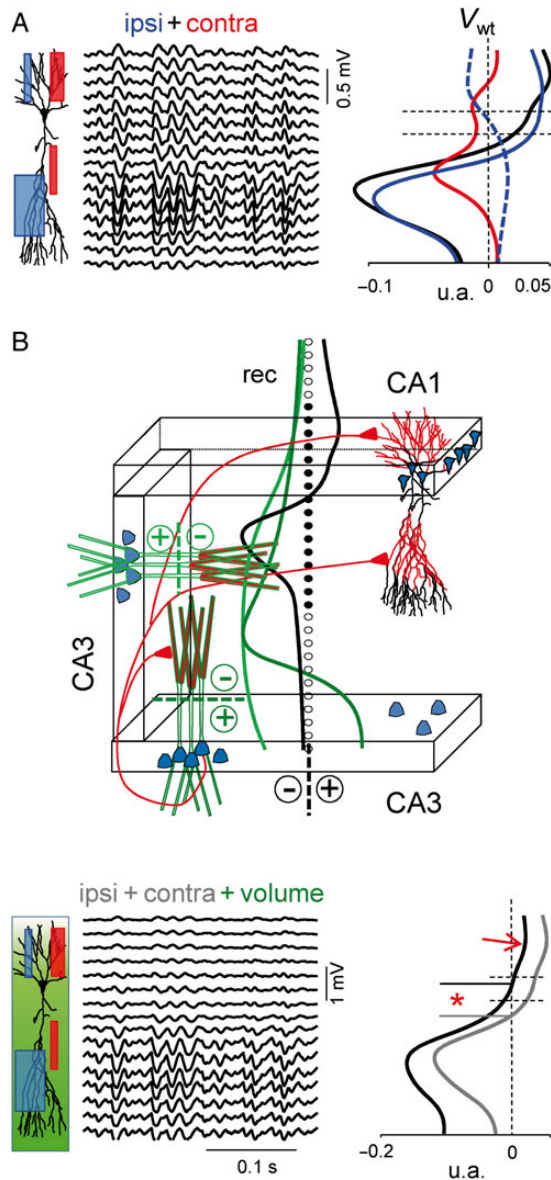


Figure 7. Apical dominance and volume conduction from nearby regions shape the CA1 spatial profiles. (A) Model LFPs. The position and width of the boxes next to the dummy of a pyramidal neuron denote the synaptic territories and the relative strengths of the ipsi- (blue) and contralateral (red) inputs to the CA1. Spatial curves in the right panel (V_{wt}) were obtained by the ICA for LFPs simulated from separate inputs or when combined (black). Both apical and basal dendritic trees were simultaneously activated, except for the blue dashed curve that belongs to selective ipsilateral activation to the basal dendrites. Note the dominant negative field in the apical tree for the contralateral input alone, even if the input in this case was stronger in the basal tree. The combined activation generates a markedly bipolar spatial distribution (apical negative) similar to the ipsilateral input alone. Thus, apical dominance for LFP generation explains the selective ipsilateral visualization of CA3-CA1 baseline events. Arbitrary units are comparable in all V_{wt} curves. (B) The influence of volume-conducted currents from concurrent local gamma waves in the nearby CA3 modifies important features of the CA1 waves. Two blocks of model neurons simulating the CA3 region were added to the CA1 model. Recurrent CA3 excitation was simulated by apical activation, and the corresponding field potentials were estimated in the CA1 recording track (black circles; filled dots conform the standard 16-sites CA1 track). The voltage introduced by each CA3 block is depicted as V_{wt} curves (green traces). Note that the different tilt of the respective dipoles projects all-negative potentials toward the CA1. The black curve belongs to the V_{wt} during joint ipsi- and contralateral CA3 activation on CA1 (as in panel A). The bottom panels show the combined local plus volume

ipsi- and contralateral CA3 populations. We next examined the contribution to CA1 potentials of the volume-conducted currents originated in the ipsilateral CA3 itself during recurrent excitation. Recurrent excitation in CA3 and ipsilateral excitation of CA1 are expected to arise from the same parent axons.

On that purpose, we designed a simplified CA3 structure including 2 perpendicular 1-mm blocks contiguous with the CA1 block (Fig. 7B; see Materials and Methods). Recurrent CA3 activation was simulated by excitatory input to CA3 apical dendrites (drawn in red) using identical time pattern of gamma excitations as for the Schaffer input to CA1. The volume-conducted LFPs were estimated on the recording track of the CA1 (black dots). The absolute voltage value produced by recurrent CA3 currents on CA1 is depicted as spatial curves in Figure 7B (green traces). The spatially tilted dipoles generated by the 2 CA3 blocks entered only negative potentials all over the CA1 recording track. When local CA1 currents were added to CA3-originated ones the joint spatial profile of CA1 potentials suffered significant qualitative changes (Fig. 7B, lower panels). Most notably, the polarity reversal of the CA3-CA1 local dipole shifted toward the cell body layer (asterisk) and the basal positivity was strongly reduced, globally adopting a dominant negative profile centered on apical dendrites as in experiments. Also, the net amplitude increased in the sites that were already negative before addition of volume currents.

These results indicate strong mutual effect of concurrent oscillations in nearby regions that may alter important landmarks employed on the cellular interpretation of LFP oscillations, such as the site of polarity reversal and the negative/positive ratio in different sites. Note that the volume contributions should barely affect the estimation of sinks and sources by CSD as the spatial gradients in the CA1 LFPs remain virtually the same.

Co-Activation of Somatic Inhibition Contributes Differentially to Spontaneous and Evoked ipsi- and Contralateral CA1 Potentials

Besides principal cells, CA3 axons also excite interneurons in the CA1, which in turn act on pyramidal cells (Buzsáki and Eidelberg 1982b; Zemankovics et al. 2013). Thus, co-activated feed-forward inhibition may influence spatial profiles of the standard Schaffer and Commissural EPs. Ipsi- and contralateral fEPSPs were elicited by activation of the CA3 in one side at an intensity that was threshold for the later and we noticed that all Schaffer potentials (Fig. 8A, blue traces) typically had little variability. In contrast, the Commissural responses that were highly unstable in the st. radiatum at low intensity (Fig. 8A, red traces) yielded consistent positive potentials with a sharp rising phase in the simultaneously recorded cell body layer (Fig. 8A, black traces). These somatic potentials were delayed by ~2 ms relative to the apical ones and may be completely detached from each other (compare subplots 6 and 7). Similar observations were made in all 8 animals tested bilaterally. Thus, apical and basal responses obtained near the threshold do not belong to the same dipole and involve different neuronal mechanisms.

configuration of CA1 LFPs (sample epoch to the left and the V_{wt} black curve to the right; for comparison, the superimposed gray curve has no volume added). The most notable changes are a shift in the polarity reversal site (asterisk), the dampening of the strong somato-basal positive potential (arrow), and absolute increase in already negative sites.

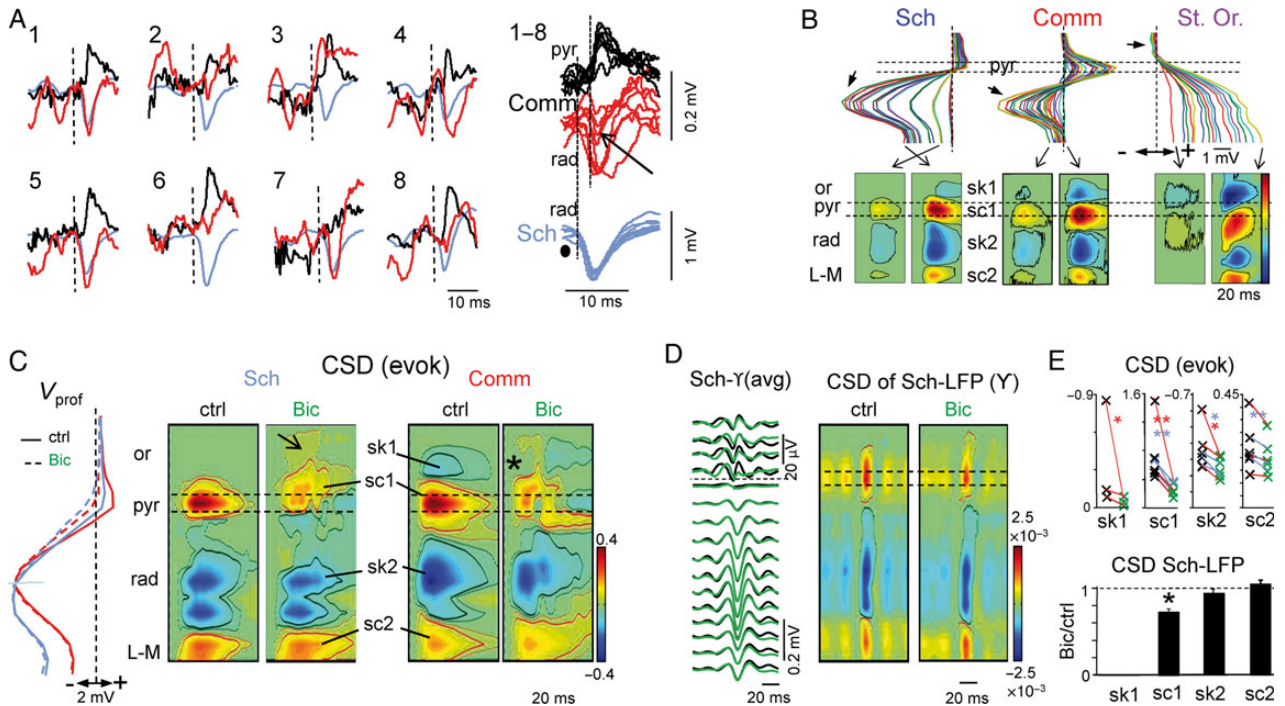


Figure 8. Somatic inhibition in CA1 is differentially co-activated by ipsi- or contralateral CA3 and merges in LFPs along with excitatory currents. (A) Eight consecutive responses to CA3 stimulation at intensities that were close to the threshold for the contralateral (Commissural) CA1 responses (vertical dashed lines, time of stimuli; black and red traces, recordings in the soma and apical layers, respectively). Note the inconsistent appearance of Commissural fEPSPs whereas the somatic potentials were readily activated. A smaller and shorter negative potential is often seen when the fEPSP failed (arrow). The ipsilateral (Schaffer) fEPSPs are in blue. (B) Upper panels correspond to CA1 spatial profiles for EPs elicited by increasing stimulus intensities in the Schaffer and Commissural pathways, and the CA3a St. Oris. The small arrows point to the negativity elicited by each stimulation site. Note the dissimilar growth of somatic positive and apical negative portions in Sch and Comm responses. The lower panels show sample CSD contour plots at 2 intensities. Note the absence of the basal sink (sk1) only during subthreshold Sch activation. CSD calibration bar (in arbitrary proportional units): Sch: ± 1.1 ; Comm and St. Or: 0.4. Results in Panels A and B belong to 2 representative experiments. (C,D,E) Sample experiments and pooled data illustrating the presence of a perisomatic inhibition concurrent to evoked (C) and spontaneous (D) CA3-CA1 excitatory potentials. (C) Left: voltage profiles (V_{prof}) for the Sch and Comm fEPSPs before (ctrl) and after local injection of the GABA_A blocker bicuculline (Bic) in the pyramidal/oriens border. Note the selective reduction of the somatic positive portion. The corresponding currents shown in the contour plots (CSD evok) to the right highlight the strong reduction of a somatic (active) source (sc1), whereas the remaining (passive) source was then able to extend into basal dendrites (arrow) after Bic. The asterisk marks the concurrent disappearance of the basal sink (sk1) before the occurrence of pop spikes (see somatic EPs below CSD plots). This st. oris sink was exclusive to the Comm response. (D) Averaged profiles of the spontaneous CA3-CA1 baseline gamma waves before (black) and after Bic (green), and the corresponding CSD contour plots. (E) Upper plots show the effect of Bic on each main source and sink (blue and red lines represent the Sch and Comm responses; $n = 3$ animals each). Lower histogram: similar data for the currents underlying spontaneous gamma waves: * $P < 0.01$; ** $P < 0.005$ (Student t-Test).

To test this inference further, we progressively increased the stimulus intensity and for each value calculated the spatial profiles of the EPs (Fig. 8B). By normalizing the spatial curves, we found an homogeneous spatial profile for ipsi- but not for contralateral inputs that presented dissimilar growth in the somato-basal and apical bands (Supplementary Fig. 5). Such results were qualitatively identical in all animals tested ($n = 5$), although the negative/positive apical/basal ratio varied considerably in different experiments (from 1:1 to 5:1). Since basal and apical excitations are expected to grow proportionally to stimulus intensity, the distinct behavior of the somato-basal band also suggests an independent mechanism with different dynamics, such as a contribution by somatic inhibition.

We verified this hypothesis by using a CSD analysis and layer-specific delivery of microdrops of GABA_A blockers Bicuculline (1 mM) or Gabazine (0.15 mM) through a recording pipette located near the linear probe, immediately above the st. pyramidale (basal side). The 2 drugs had qualitatively similar effects (Gabazine results are shown in Supplementary Fig. 6). The profiles of ipsi- and contralateral EPs before and after Bicuculline injection clearly show that, the GABA_A blocker selectively reduced the somatic positivity for both the Schaffer and Commissural

responses without affecting other parts of the potential profiles (Fig. 8C, left panel, V_{prof}). The spatial selectivity of changes in current sources and sinks induced by somato-basal GABA blockade indicated that the main reduction in the CSD occurs at the location of active currents (Fig. 8C, sc1) in the st. pyramidale (marked by the parallel dashed lines) and to a lesser extent in the surrounding basal and apical bands (sk1 and sk2). On average, the somatic source decreased by 55% and 66% for the Schaffer and Commissural responses ($n = 4$ animals; $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively; Student t-test; Fig. 8E, pooled data for each source and sink in upper plot). Somewhat surprisingly there was a nearly complete disappearance of the basal sink sk1 (Fig. 8C, asterisk in site of its absence), which was only present in the Commissural response in the controls. Thus, this basal sink is mainly contributed by passive inward currents driven by somatic inhibition rather than by direct basal excitation. Note the shift and extension of the remaining source toward the basal tree, indicating the reach of capacitive currents from apical excitation upon withdrawal of the concurrent inhibitory somatic shunt.

Similar findings were obtained for the spontaneous activity. We detected gamma events in the Schaffer LFP generator (see Materials and Methods) and averaged these events (over 8000

gamma waves). When the spatial structure of a typical gamma wave and its CSD was analyzed before (black traces) and after (green traces) Bicuculine injection, a small discrepancy can be appreciated in the somato-basal region (Fig. 8D). Furthermore, a significant reduction of the somatic source (by 28%) was found in the corresponding CSDs (pooled data in Fig. 8E, lower plot; $P < 0.05$; $n = 3$).

These observations indicate that different degrees of co-activated inhibition modulate the Schaffer and Commissural evoked profiles distinctly, equalizing them to the spontaneous ipsilateral CA3-CA1 LFPs.

Recurrent CA3-CA3 Input Also Produces LFPs

Let us now consider the recurrent CA3-CA3 excitation. In a representative spatial profile of the Schaffer component of LFPs obtained by ICA from a recording spanning both the CA1 and CA3 (Fig. 9A, left panel, black curve), a main hump is evident in the CA1 (corresponding to the CA3-CA1 Schaffer input) and a smaller one in the st. radiatum of the CA3 subfield (blue arrow). Since both humps appear in the same LFP generator, we may assume strong synchronization between the LFP activities in the ipsilateral CA1 and CA3 originated by spikes in the same CA3. Nevertheless, the group of cells forming the afferent assembly may differ for each of the targets, due to the distinct regional topology, and hence, the detailed temporal structure of the individual gamma waves in the 2 subfields may differ. To explore this possibility, we adopted a different strategy. Since there is no spatial overlap between synaptic terminals in this situation (target cells/regions are different, not as for Sch and Comm inputs to the same CA1 pyramidal cells [Fig. 7]), we can select a group of recording sites spanning either the CA3 or the CA1 subfields only (split analysis, right panels) rather than applying an ICA across all the LFPs (Fig. 9A, left panel). In this way, we increase the relative variance of local sources on each subfield, and hence, the temporal accuracy. The LFP components obtained in this way had a similar spatial profile as the corresponding section when analyzed jointly: black and blue curves in upper and lower plots, termed Sch and CA3_e generators, respectively. An additional significant component, termed CA3_i, is routinely found that presented a maximum in the st. pyramidale (Fig. 9A, purple), and it has been previously identified as an inhibitory somatic input (Benito et al. 2014).

The mean power of the reconstructed pathway-specific CA3_e component (at the site of maximum amplitude) was 0.033 ± 0.08 mV² (about half the CA1 Schaffer component; $n = 4$ animals: Fig. 9B), whereas the CA3_i produced 0.006 ± 0.003 mV². We noticed that the CA3_e spatial component was typically mounted on a wider base (blue shaded area in Fig. 9A), at least in part due to remote CA1 Sch LFPs, and hence we corrected the local values by removing the excess variance to 0.009 ± 0.003 mV² (i.e., ~9 times smaller; Makarov et al. 2010). The CC between temporal activation (Fig. 9C) reflected significant differences (0.4 ± 0.06 between Sch and CA3_e and -0.46 ± 0.08 between Sch and CA3_i; epochs lasting 730–1000 seconds in 4 different animals and excluding theta periods) and such a relatively low correlation was in part due to the divergence of the temporal course of gamma waves. In a sample epoch in which voltage fluctuations and the corresponding CSD profiles were reconstructed, the CA3_e clearly exhibits dendritic sink/source pairs that tightly match the CA1 Sch sinks, whereas the CA3_i component returned strong somatic sources and preceded (Fig. 9D). We built PDHs for the phase shift in order to study the phase coupling between different components (Fig. 9E, see a representative experiment in the upper histograms).

Both the Sch-CA3_e and Sch-CA3_i histograms suggest statistically significant phase coupling between components, albeit with a different phase lag. This was estimated by the PLV between pairs of components (middle histogram, pooled data for $n = 4$ animals), which was statistically significant in all cases and slightly higher for the Sch-CA3_i pair. We found practically zero phase lag ($6.7^\circ \pm 1.7^\circ$) from the Sch to the CA3_e component, as opposed to $113.4^\circ \pm 10.2^\circ$ to the CA3_i (Fig. 9E, lower histogram). Note that the CA3_i component is not strictly a monosynaptic CA3 response but it is overtly coupled with the CA3_e component, probably reflecting the interplay of local excitatory and inhibitory pathways on intrinsic gamma generation in this region.

If we assess the averages exhibited by all LFP components using the timings of isolated gamma waves in CA1 extracted by the Haar wavelet transform method (Fig. 9F, upper plots, the characteristics of the individual gamma waves are shown in the lower plots with data pooled from $n = 4$ animals; see Materials and Methods), the mean amplitude of corrected CA3_e waves was 48 ± 13 μ V (i.e., ~3–4 times smaller than Sch waves). In contrast, the mean duration of these waves was 18.2 ± 0.7 ms, compared with 20.7 ± 0.7 ms and 15.8 ± 0.9 ms for the Sch and the CA3_i waves, respectively.

Discussion

In previous studies, we gathered empirical evidence supporting an essential role of cytoarchitectonic factors on the amplitude and polarity of LFPs, with a particular focus on the anatomical pathways connecting afferent and target populations. By studying the LFPs produced by a single origin population on their multiple targets, here we have reported how additional functional factors such as the timing of synaptic currents, volume conduction from nearby targets, and interaction with co-activated inhibition combine to structural ones and produce significant target-specific modulations. Besides the amplitude and polarity, these affect other key parameters such as the frequency characteristics or the site for polarity reversal, which are necessary for a correct interpretation of the cellular basis of LFPs and their use on functional studies. As a case in point we show that the spontaneous output of CA3 pyramidal assemblies raise strong oscillatory gamma LFPs in the ipsilateral CA1 through Schaffer collaterals, as well as in the CA3 itself through recurrent connections, although their synchronization is not complete. This, probably, occurs due to the distinct topology and differential summation of excitatory currents in individual target neurons of different morphoelectric structure. However, no sizable LFPs are generated in the LS and in the contralateral CA1 targets. Overall, the strong modulation of 1LFPs produced by input from a common population of origin demands careful consideration of geometric and functional factors in target populations, for which pathway contribution and precise spatial profiles are needed.

Electrophysiological studies of cognitive and behavioral processes have established functional connectivity among different neuron assemblies that shape the information flow through convergent and divergent pathways underlying brain function. A remarkable example is the bilateral CA3 region of the hippocampus, which plays the role of a network hub (Le Duigou et al. 2014). Its output is transmitted to a number of regions, apparently on a cell cluster basis (Fernández-Ruiz et al. 2012a), through axon collaterals of the same parent neurons (Swanson et al. 1981) that constitute the structural basis for divergence and parallel circuits. The functional properties of this and other middle scale networks can be assessed by correlating LFPs recorded from different regions. However, raw LFPs are typically contaminated and even dominated by remote sources, whereas the dynamics of

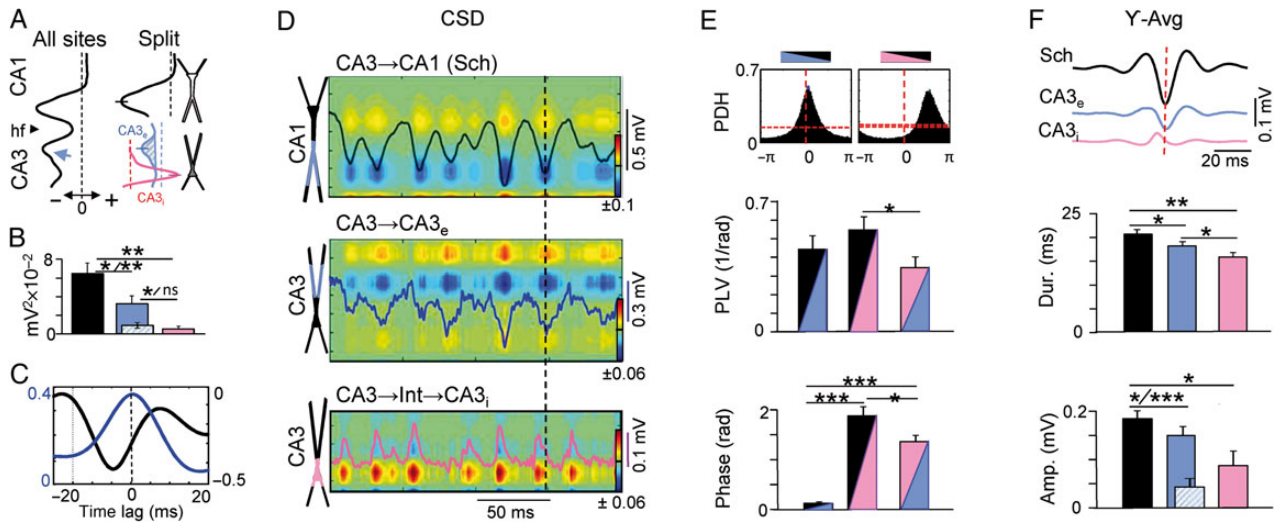


Figure 9. Excitatory and inhibitory recurrent contributions to CA3 LFPs. (A) Left: spatial profile of the characteristic Sch component (black profile) obtained by an ICA from CA1/CA3 linear LFPs, which also contain a local CA3 maximum (blue arrow). Right: the excitatory CA1 (Sch, in black) and CA3 recurrent components (shaded area) can be split by separate analysis of the CA1 and CA3 groups of recordings, thereby optimizing the temporal accuracy of local generators in each subfield. The CA3_e peaked in the st. radiatum and an additional perisomatic CA3_i component (pink) was found. Data from a representative experiment. (B) Population data ($n = 4$ animals) for the mean power of all 3 components quantified at the site of maximum power (marked by dashes in A). The CA3_e component was corrected to remove the volume contribution from CA1 (dashed bar; statistical tests were calculated in both cases). (C) Cross-correlation between Schaffer and CA3e (blue), and Schaffer and CA3i components (black) in a representative experiment. (D) CSD analysis of a sample epoch. The voltage fluctuation of each LFP component is superimposed in the contour plots. The Sch and CA3_e components displayed dominant sinks in the respective st. radiatum, whereas the CA3_i displayed a strong somatic source (inhibitory). Note the similar pace of gamma waves in the Sch and CA3_e (albeit with different amplitudes), and the out-phased waves in the CA3_i generator (the vertical line is for visual reference). The colored bars are for calibration in arbitrary proportional units. (E) Upper histograms are PDHs between the time activations of LFP components quantifying the temporal relationship between excitatory and inhibitory gamma waves in long epochs in a representative experiment. Two-colored bars indicate the crossings: black, Schaffer; blue, CA3_e; pink, CA3_i. The maximum probability and preferred phases are measured by the PLV and Phase histograms below. (F) Upper traces are averaged LFP components of a representative 15-min epoch using the timings of the individual gamma waves in the CA1 obtained by a Haar wavelet analysis. Note the identical polarity for the Sch and CA3_e gamma waves, and the opposing polarity of the CA3_i perisomatic waves. The histograms below represent the pooled data of the mean amplitude and duration of gamma waves across animals: * $P < 0.01$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$ (Student t -Test; $n = 4$ animals).

local sources may contribute little to the signals recorded, as shown here for the LS. General biophysical arguments anticipate a significant difference in LFPs produced by the very same input in different target populations, but the mechanisms are varied and have to be studied in each particular case.

Identification of CA3-Specific LFPs

While the biophysical basis of LFPs has been well described (Elul 1971; Nunez and Srinivasan 2006), their practical use has been rather limited due to the practical difficulties to recover pathway-specific synaptic currents from mixed LFPs. Recently, the disentanglement of LFPs into pathway-specific components by ICA has proven efficient in different structures and species (Benito et al. 2014; Makarova et al. 2014). This permitted us to extract the CA3-originated LFPs from different targets.

We easily identified the CA3 contribution to the ipsilateral CA1 and to the CA3 itself, in agreement with previous studies. The Schaffer input to the CA1 produces the strongest LFPs and in the CA3, local axon branches of pyramidal neurons also evoke strong LFPs, albeit of a lower amplitude. The localization of underlying currents in the CA3 st. radiatum suggests the recurrent nature of this input (Le Duigou et al. 2014) since the contralateral CA3-CA3 projection terminates in the basal dendritic tree (Blackstad 1956).

When dealing with the LS, it was soon clear that the CA3 contribution was not significant since nearly all the LFP power accumulated in 2 remote sources with possible origin in the cortex and hippocampus. Thus, raw LFPs in the LS contain little information about the CA3 input. By no means is this indicative of a poor or inefficient CA3 input but, rather that the spatial factors

for LFP production are inappropriate. In fact, the LS neurons fire efficiently upon CA3 input as the smallest fEPSPs in the CA1 produce spike and even di-synaptic currents in septal EPs. Also, very small SPWs known to originate through CA3 synchronous firing could be appreciated.

Spatial Factors Scaling LFPs

Due to the extremely low contribution of CA3 to LFPs in the contralateral CA1 and in the LS, it was necessary to use computational models to explore the factors responsible. Though significant effort has been devoted to study the temporal patterns that maximize population activity (Pauluis et al. 1999; Ho et al. 2012), parametric studies of temporal input only cannot be used directly unless realistic units and populations with 3D definition are implemented in order to allow extracellular currents to add or subtract (Makarova et al. 2011). Since we used identical input to CA1 and LS models, as expected from a common origin population, the results can be interpreted in postsynaptic terms (geometry and other local factors). Indeed, spatial factors are those that limit LFP amplitude and polarity. No matter how strong or synchronous an input is, it will not produce sizable EPs and LFPs unless the target cell's morphology and spatial arrangement, and the input configuration, are suitable to achieve net charge separation in the extracellular space. The small cell size in the LS in comparison with pyramidal neurons already decreases the amount of the net current injected to the extracellular space. The partially radial dendritic structure promotes closed electric field with limited spatial extent. Finally, scattered arrangement of LS cells in the volume precludes proper addition

of electric fields: inward and outward currents of different nearby cells effectively cancel each other. These factors strongly limit the LFP amplitude of local sources in the LS.

The missing contralateral CA3 contribution may appear unexpected. The near complete synchrony and the heavy overlap of synaptic domains with the ipsilateral input raise the possibility of a mixed bilateral contribution. Had the 2 inputs been less synchronous, their disclosure by the ICA may have been possible, as suggested by the model. However, the presence of unilateral gamma waves (i.e., waves that appear either in the left or right CA1 alone), the discrepancy between the LFP and EP spatial profiles, and the inactivation experiments point to a small amount of additional net current produced by the contralateral input. Although anatomical data point to the CA1 basal tree as the preferred site at which contralateral CA3 axons terminate, the more abundant ipsilateral contacts with higher density in the LFP-favorable apical tree (Shinohara et al. 2012) may be sufficient to mask the weaker contralateral contribution. The model also indicates that apical dominance for LFP production is based on the much higher dipolar moment of synapses in the apical shaft compared with lateral branches (see [Supplementary movie M1](#)). Indeed, the addition of basal input does not significantly modify the apical dipole when both dendritic trees are naturally activated from CA3 in either side. Conveniently, the time course of the contralateral input is still precisely defined by the ipsilateral CA3-CA1 input in the other hemisphere.

Notably, we find no basal current sinks for CA1 spontaneous gamma waves or ipsilateral EPs at low intensity, despite the fact that ipsilateral axons also terminate there. Different EP profiles are expected from the varying septo-temporal apical to basal ratio of axon collaterals that originate in different sectors of the CA3 (Ishizuka et al. 1990; Li et al. 1994; Roth and Leung 1995; Leung and Pélouquin 2010). Yet, additional factors must concur to explain the different spatial behavior of evoked and spontaneous activities. For instance, a short-latency basal sink is only observed upon selective ipsilateral basal or contralateral stimulation that has been thought to reflect basal excitation (Buzsáki and Eidelberg 1982a; Kaibara and Leung 1993; this paper). However, at least in the latter case, the EP is also contributed by an active somatic source. This is supported by several lines of evidence, 1) the independent behavior of somatic and apical potentials in individual trials, 2) the different dynamics of basal and somatic ipsi- and contralateral potentials upon increasing intensity, and 3) the disappearance of the contralateral sink/source basal pair following GABA-A blockade. Noticeably, the concurrence of excitatory and inhibitory currents modifies the intracellular spread of the former (Liu 2004; Willadt et al. 2013). Since there are multiple layer-specific inhibitory microcircuits (Somogyi and Klausberger 2005), one may expect their dynamic interaction with excitatory inputs to differ when these are mildly activated as during natural gamma waves, or when they become abnormally synchronous (e.g., EPs), hence the potential and current profiles too. In addition, sustained (DC) spatial gradients of potential are present through hippocampal layers in vivo that are state dependent (Gloor et al. 1963; Brankač et al. 1993). Such synaptic envelopes go unnoticed in standard AC-coupled recordings (Martín-Vázquez et al. 2013) and therefore not considered in present models, which may also explain minor spatial differences.

Volume Conduction from Nearby Concurrent Waves Deeply Influences LFP Parameters

The extraction of pathway-specific LFPs through the ICA allows the gathering of spatial curves of voltage weight that facilitate

the anatomical matching (Benito et al. 2014) and their identification as local or remote from the curved or quasilinear distribution, respectively. In cases when 2 nearby generators have highly correlated activity such as the ipsilateral Schaffer and recurrent CA3 generators, they appear as one, albeit the separated CA1 and CA3 synaptic territories create multimodal spatial distributions in CA1/CA3 combined recording tracks. We unveiled subtle differences in the respective temporal activations of these 2 CA3 targets by separate analysis of recordings in the 2 regions. Even more relevant we show that the far fields of each still contaminate one another and may alter significantly local parameters.

For instance, while the Schaffer generator displays a dominant negative distribution through the apical CA1 reversing to a mild positivity in the cell body layer, the theoretical estimations for this generator always give a rather balanced negative/positive dipole reversing $\sim 100\ \mu\text{m}$ below. Such discrepancy is explained by the absence of volume conduction in the first set of CA1-only models, since the addition of the CA3 adjacent structures and the negative far fields raised by them to the local CA1 recordings of the Schaffer generator led to a tight fit of model and experimental profiles. The amplitude, the site of polarity reversal, and the positive/negative ratio are all modified. Such rectification only concerns to multiple sources with concurrent gamma waves and tight phase coupling. However, the multiple sources of gamma activity in the hippocampus with independent activity (Makarov et al. 2010; Fernandez-Ruiz et al. 2012a, 2013; Schomburg et al. 2014) display epochs with variable phase coupling between them. This makes necessary to consider volume conduction as a possible confounding factor in the identification of gamma generators and their dynamical relations. It may also apply to neocortical gamma oscillators (Sirota et al. 2008), although to our knowledge reliable techniques for spatial discrimination as the ICA have not been employed so far in this structure and the claimed independence of different oscillations requires re-assessment for pathway-specificity.

The Temporal Structure of CA3-Driven LFPs in Different Targets

We previously described excitatory gamma waves in the CA1 LFPs elicited by the CA3 (Fernández-Ruiz et al. 2012a). In this study, we assessed the bilateral nature of these waves and we show that CA3-induced LFP oscillations in the left and right CA1 are mostly composed of bilateral synchronous gamma events. We also identified a sizable number of waves not associated with a pair in opposite side. Thus, though the bilateral CA1 exhibits a high degree of gamma synchronization, intermittent firing slips in a CA3 assembly in one side may occasionally interrupt the oscillations.

Since the CA3 LFP generator is strongest in the ipsilateral CA1, its time course is more reliable. Therefore, we used gamma events in CA1 as a time reference to study the temporal structure and phase relation of LFPs in other CA3 targets. Two LFP generators in the CA3 exhibit strong coherence and phase coupling with gamma events in CA1. The alternating recurrent dendritic excitatory and somatic inhibitory gamma waves separated by the ICA constitute the extracellular correlate of the endogenous pacemaker of gamma oscillations (Oren et al. 2006). Notably, the amplitude of individual excitatory gamma waves in CA1 and CA3 was not fully correlated with either precedent or subsequent inhibitory waves, which should be interpreted as a result of the different topology and spatial organization of the connections in these interwoven networks (Benito et al. 2014). In the LS, CA3-induced

gamma waves were apparently noise-buried with extremely low amplitude but were uncovered by massive averaging using the CA1 waves as reference.

Importantly, the different size and morphology of target cells also has an impact on the intracellular summation of inputs, which translates into modified frequency characteristics of the ensemble LFP in different targets. This may constitute a confounding factor when using phase and coherence as correlates of functional connectivity between different structures (Florian et al. 1998). Coherent LFP oscillations have been interpreted as a reflection of long-distance synchronization and as a binding feature in object perception (Roelfsema et al. 1997; Rodríguez et al. 1999). So far, these oscillations have not been investigated using spatial discrimination techniques that reveal their single or multiple synaptic origins. As an example, the gamma waves in the CA3 region were found to be a composite of recurrent excitatory and feed-forward inhibitory waves, and their correct relations to other events (spikes or other oscillations) require reliable separation using spatial discrimination.

Concluding Remarks

Only a few years ago, hippocampal gamma oscillations were considered fundamentally inhibitory on the basis of concurrent phase firing of inhibitory neurons in the CA3 and CA1 regions, with the former driving the latter through gamma-paced output of CA3 pyramidal cells (Mann and Paulsen 2007). The disentanglement of pathway-specific contributions to hippocampal LFPs showed that all synaptic pathways contributing to hippocampal LFPs convey some gamma oscillations albeit with independent dynamics (Makarov et al. 2010). Distinct laminar coherence also supported multiple synaptic origins of gamma oscillations (Scheffer-Teixeira et al. 2012). Some of these are patently excitatory in nature such as the CA3-CA1 here studied, or those from entorhinal cortices to the DG (Fernández-Ruiz et al. 2012a, 2013; Benito et al. 2014; Schomburg et al. 2014). The emergent viewpoint is that while local inhibitory networks appear better suited to set the pace for network oscillations, LFP oscillations may be either excitatory or inhibitory. Therefore, the population of origin should be unequivocally identified. Since the polarity of synaptic currents does not determine the dominant polarity of LFPs (e.g., Fernández-Ruiz et al. 2013), it is becoming increasingly evident that accurate extraction and identification of pathway-specific oscillations is necessary to avoid spurious correlations. The present work sets up the relevance of some functional factors that combine with structural ones that should all be taken into account when attempting to discern the spatiotemporal code and mechanisms of information processing through LFPs.

Supplementary Material

Supplementary material can be found at: <http://www.cercor.oxfordjournals.org/>.

Funding

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Education (BFU2010-19192/BFI to O.H. and FIS2010-20054 to V.A.M.), and the Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2013-41533R to O.H., and FIS2014-57090-P to V.A.M.). G.M.-V. is depositary of a PhD grant from the Ministry of Education (FPU AP2010-1278).

Notes

We thank Mark Sefton (BiomedRed) for editorial support. *Conflict of Interest:* None declared.

References

- Alonso JR, Frotscher M. 1989. Organization of the septal region in the rat brain: a Golgi/EM study of lateral septal neurons. *J Comp Neurol.* 286:472–487.
- Bannister NJ, Larkman AU. 1995a. Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns. *J Comp Neurol.* 360:150–160.
- Bannister NJ, Larkman AU. 1995b. Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: II. Spine distributions. *J Comp Neurol.* 360:161–171.
- Bell A, Sejnowski T. 1995. An information-maximization approach to blind separation and blind deconvolution. *Neural Comput.* 7:1129–1159.
- Benito N, Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Makarova J, Korovaichuk A, Herreras O. 2014. Spatial blocks of coherent pathway-specific LFPs in the hippocampus reflect different modes of presynaptic synchronization. *Cereb Cortex.* 24:1738–1752.
- Blackstad TW. 1956. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol.* 105:417–537.
- Bower JM, Beeman D. 1998. *The Book of Genesis. Exploring Realistic Neural Models with the GEneral NEural Simulation System.* 2nd ed. New York: Springer.
- Brankač J, Stewart M, Fox SE. 1993. Current source density analysis of the hippocampal theta rhythm: associated sustained potentials and candidate synaptic generators. *Brain Res.* 615:310–327.
- Bressler SL, Coppola R, Nakamura R. 1993. Episodic multiregional cortical coherence at multiple frequencies during visual task performance. *Nature.* 366:153–156.
- Bullock TH, McClune MC, Enright JT. 2003. Are the electroencephalograms mainly rhythmic? Assessment of periodicity in wide-band time series. *Neuroscience.* 121:233–252.
- Buzsáki G, Eidelberg E. 1982a. Convergence of associational and commissural pathways on CA1 pyramidal cells of the rat hippocampus. *Brain Res.* 237:283–295.
- Buzsáki G, Eidelberg E. 1982b. Direct afferent excitation and long-term potentiation of hippocampal interneurons. *J Neurophysiol.* 48:597–607.
- Canals S, López-Aguado L, Herreras O. 2005. Synaptically-recruited apical currents are required to initiate axonal and apical spikes in hippocampal pyramidal cells: modulation by inhibition. *J Neurophysiol.* 93:909–918.
- Chawla D, Friston KJ, Lumer ED. 2001. Zero-lag synchronous dynamics in triplets of interconnected cortical areas. *Neural Netw.* 14:727–735.
- Chee SS, Menard JL, Dringenberg HC. 2015. The lateral septum as a regulator of hippocampal theta oscillations and defensive behavior in rats. *J Neurophysiol.* doi:10.1152/jn.00806.2014
- Chen A. 2006. Fast kernel density independent component analysis. *Lecture Notes Comput Sci.* 3889:24–31.
- Choi S, Cichocki A, Park HM, Lee SY. 2005. Blind source separation and independent component analysis: a review. *Neur Inf Process Let Rev.* 6:1–57.
- Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G. 2003. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron.* 37:311–322.

- DeFrance JF, Kitai ST, Shimono T. 1973. Electrophysiological analysis of the hippocampal-septal projections. I. Response and topographical characteristics. *Exp Brain Res*. 17:447–462.
- Eckhorn R, Bauer R, Jordan W, Brosch M, Kruse W, Munk M, Reitboeck HJ. 1988. Coherent oscillations: a mechanism of feature linking in the visual cortex? Multiple electrode and correlation analyses in the cat. *Biol Cybern*. 60:121–130.
- Elul R. 1971. The genesis of the EEG. *Int Rev Neurobiol*. 15:228–272.
- Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Benito N, Herreras O. 2012a. Schaffer-specific local field potentials reflect discrete excitatory events at gamma frequency that may fire postsynaptic hippocampal CA1 units. *J Neurosci*. 32:5165–5176.
- Fernández-Ruiz A, Makarov VA, Herreras O. 2012b. Sustained increase of spontaneous input and spike transfer in the CA3-CA1 pathway following long term potentiation in vivo. *Front Neural Circuits*. 6:71.
- Fernández-Ruiz A, Muñoz S, Sancho M, Makarova J, Makarov VA, Herreras O. 2013. Cytoarchitectonic and dynamic origins of giant positive LFPs in the Dentate Gyrus. *J Neurosci*. 33:15518–15532.
- Finnerty GT, Jefferys JG. 1993. Functional connectivity from CA3 to the ipsilateral and contralateral CA1 in the rat dorsal hippocampus. *Neuroscience*. 56:101–108.
- Florian G, Andrew C, Pfurtscheller G. 1998. Do changes in coherence always reflect changes in functional coupling? *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 106:87–91.
- Freeman JA, Nicholson C. 1975. Experimental optimization of current source-density technique for anuran cerebellum. *J Neurophysiol*. 38:369–382.
- Glabska H, Potworowski J, Leski S, Wojcik DK. 2014. Independent components of neural activity carry information on individual populations. *PLoS ONE*. 9(8):e105071.
- Gloor P, Vera CL, Sperti L. 1963. Electrophysiological studies of hippocampal neurons. I. Configuration and laminar analysis of the “resting” potential gradient, of the main-transient response to performant path, fimbrial and mossy fiber volleys and of “spontaneous” activity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 15:353–378.
- Herreras O. 1990. Propagating dendritic action potential mediates synaptic transmission in CA1 pyramidal cells in situ. *J Neurophysiol*. 64:1429–1441.
- Herreras O, Solís JM, Martín del Río R, Lerma J. 1987. Characteristics of CA1 activation through the hippocampal trisynaptic pathway in the unanesthetized rat. *Brain Res*. 413:75–86.
- Herreras O, Solís JM, Muñoz MD, Martín del Río R, Lerma J. 1988. Sensory modulation of hippocampal transmission. I. Opposite effects on CA1 and dentate gyrus synapses. *Brain Res*. 451:290–302.
- Ho ECY, Strüber M, Bartos M, Zhang L, Skinner FK. 2012. Inhibitory networks of fast-spiking interneurons generate slow population activities due to excitatory fluctuations and network multistability. *J Neurosci*. 32:9931–9946.
- Hutchison RM, Mirsattari SM, Jones CK, Gati JS, Leung LS. 2010. Functional networks in the anesthetized rat brain revealed by independent component analysis of resting-state fMRI. *J Neurophysiol*. 103:3398–3406.
- Ibarz JM, Makarova J, Herreras O. 2006. Relation of apical dendritic spikes to output decision in CA1 pyramidal cells during synchronous activation: a computational study. *Eur J Neurosci*. 23:1219–1233.
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. 1990. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol*. 295:580–623.
- Jakab RL, Leranath C. 1990. Somatospiny neurons in the rat lateral septal area are targets of hippocamposeptal fibers: a combined EM/Golgi and degeneration study. *Synapse*. 6:12–22.
- Kaibara T, Leung LS. 1993. Basal versus apical dendritic long-term potentiation of commissural afferents to hippocampal CA1: a current source density analysis. *J Neurosci*. 13:2391–2404.
- Korovaichuk A, Makarova J, Makarov VA, Benito N, Herreras O. 2010. Minor contribution of principal excitatory pathways to hippocampal LFPs in the anesthetized rat: a combined independent component and current source density study. *J Neurophysiol*. 104:484–497.
- Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J, Varela FJ. 1999. Measuring phase synchrony in brain signals. *Human Brain Mapp*. 8:194–208.
- Laurberg S. 1979. Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus. *J Comp Neurol*. 184:685–708.
- Le Duigou C, Simonnet J, Teleńczuk MT, Fricker D, Miles R. 2014. Recurrent synapses and circuits in the CA3 region of the hippocampus: an associative network. *Front Cell Neurosci*. 7:262.
- Leung LS, Péloquin P. 2010. Cholinergic modulation differs between basal and apical dendritic excitation of hippocampal CA1 pyramidal cells. *Cereb Cortex*. 20:1865–1877.
- Leung LS, Péloquin P, Canning KJ. 2008. Paired-pulse depression of excitatory postsynaptic current sinks in hippocampal CA1 in vivo. *Hippocampus*. 18:1008–1020.
- Li XG, Somogyi P, Ylinen A, Buzsáki G. 1994. The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol*. 339:181–208.
- Liu G. 2004. Local structural balance of functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. *Nat Neurosci*. 7:373–379.
- Lindén H, Tetzlaff T, Potjans TC, Pettersen KH, Grün S, Diesmann M, Einevoll GT. 2011. Modeling the spatial reach of the LFP. *Neuron*. 72:859–872.
- López-Aguado L, Ibarz JM, Herreras O. 2001. Activity-dependent changes of tissue resistivity in the CA1 region in vivo are layer-specific: modulation of evoked potentials. *Neuroscience*. 108:249–262.
- Makarov VA, Makarova J, Herreras O. 2010. Disentanglement of local field potential sources by independent component analysis. *J Comp Neurosci*. 29:445–457.
- Makarova J, Ibarz JM, Makarov VA, Benito N, Herreras O. 2011. Parallel readout of pathway-specific inputs to laminated brain structures. *Front Syst Neurosci*. 5:77.
- Makarova J, Ortuño T, Korovaichuk A, Cudeiro J, Makarov VA, Rivadulla C, Herreras O. 2014. Can pathway-specific LFPs be obtained in cytoarchitectonically complex structures? *Front Syst Neurosci*. 8:66.
- Makeig S, Jung TP, Bell AJ, Ghahremani D, Sejnowski TJ. 1997. Blind separation of auditory event-related brain responses into independent components. *PNAS*. 94:10979–10984.
- Mann EO, Paulsen O. 2007. Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci*. 30:343–349.
- Martín-Vázquez G, Makarova J, Makarov VA, Herreras O. 2013. Determining the true polarity and amplitude of synaptic currents underlying gamma oscillations of local field potentials. *PLoS One*. 8(9):e75499.
- McLennan H, Miller JJ. 1974. The hippocampal control of neuronal discharges in the septum of the rat. *J Physiol*. 237:607–624.
- McNaughton N, Miller JJ. 1986. Collateral specific long term potentiation of the output of field CA3 of the hippocampus of the rat. *Exp Brain Res*. 62:250–258.

- Nunez PL, Srinivasan R. 2006. *Electric Fields of the Brain: The Neurophysics of EEG*. 2nd ed. New York: Oxford University Press.
- Oren I, Mann EO, Paulsen O, Hájos N. 2006. Synaptic currents in anatomically identified CA3 neurons during hippocampal gamma oscillations in vitro. *J Neurosci*. 26:9923–9934.
- Panula P, Revuelta AV, Cheney DL, Wu JY, Costa E. 1984. An immunohistochemical study on the location of GABAergic neurons in rat septum. *J Comp Neurol*. 222:69–80.
- Pauluis Q, Baker SN, Olivier E. 1999. Emergent oscillations in a realistic network: the role of inhibition and the effect of the spatiotemporal distribution of the input. *J Comput Neurosci*. 6:27–48.
- Pedemonte M, Barrenechea C, Núñez A, Gambini JP, García-Austt E. 1998. Membrane and circuit properties of lateral septum neurons: relationships with hippocampal rhythms. *Brain Res*. 800:145–153.
- Rajagovindan R, Ding M. 2008. Decomposing neural synchrony: toward an explanation for near-zero phase-lag in cortical oscillatory networks. *PLoS One*. 3(11):e3649.
- Rappelsberger P, Pockberger H, Petsche H. 1981. Current source density analysis: methods and application to simultaneously recorded field potentials of the rabbit's visual cortex. *Pflügers Arch*. 389:159–170.
- Rodriguez E, George N, Lachaux JP, Martinerie J, Renault B, Varela FJ. 1999. Perception's shadow: long-distance synchronization of human brain activity. *Nature*. 397:430–433.
- Roelfsema PR, Engel AK, Konig P, Singer W. 1997. Visuomotor integration is associated with zero time-lag synchronization among cortical areas. *Nature*. 385:157–161.
- Roth LR, Leung LS. 1995. Difference in LTP at basal and apical dendrites of CA1 pyramidal neurons in urethane-anesthetized rats. *Brain Res*. 694:40–48.
- Scheffer-Teixeira R, Belchior H, Caixeta FV, Souza BC, Ribeiro S, Tort AB. 2012. Theta phase modulates multiple layer-specific oscillations in the CA1 region. *Cereb Cortex*. 22:2404–2414.
- Schomburg EW, Fernández-Ruiz A, Mizuseki K, Berényi A, Anastassiou CA, Koch C, Buzsáki G. 2014. Theta phase segregation of input-specific gamma patterns in entorhinal-hippocampal networks. *Neuron*. 84:470–485.
- Schreiber T, Schmitz A. 2000. Surrogate time series. *Physica D*. 142:646–652.
- Shinohara Y, Hosoya A, Yahagi K, Ferecsko AS, Yaguchi K, Sik A, Itakura M, Takahashi M, Hirase H. 2012. Hippocampal CA3 and CA2 have distinct lateral innervation patterns to CA1 in rodents. *Eur J Neurosci*. 35:702–710.
- Sirota A, Montgomery S, Fujisawa S, Isomura Y, Zugaro M, Buzsáki G. 2008. Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. *Neuron*. 60:683–697.
- Somogyi P, Klausberger T. 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol*. 562:9–26.
- Stone JV, Porrill J, Porter NR, Wilkinson ID. 2002. Spatiotemporal independent component analysis of event-related fMRI data using skewed probability density functions. *Neuroimage*. 15:407–421.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Cowan WM. 1981. Evidence for colateral projections by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus, and the subiculum: a multiple retrograde labelling study in the rat. *J Neurosci*. 1:548–559.
- Takamura Y, Tamura R, Zhou TL, Kobayashi T, Tran AH, Eifuku S, Ono T. 2006. Spatial firing properties of lateral septal neurons. *Hippocampus*. 16:635–644.
- Trommald M, Jensen V, Andersen P. 1995. Analysis of dendritic spines in rat CA1 pyramidal cells intracellularly filled with a fluorescent dye. *J Comp Neurol*. 353:260–274.
- Varona P, Ibarz JM, López-Aguado L, Herreras O. 2000. Macroscopic and subcellular factors shaping CA1 population spikes. *J Neurophysiol*. 83:2192–2208.
- Vinogradova OS. 2001. Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus*. 11:578–598.
- Willadt S, Nenniger M, Vogt KE. 2013. Hippocampal feedforward inhibition focuses excitatory synaptic signals into distinct dendritic compartments. *PLoS One*. 8(11):e80984.
- Zemankovics R, Veres JM, Oren I, Hájos N. 2013. Feedforward inhibition underlies the propagation of cholinergically induced gamma oscillations from hippocampal CA3 to CA1. *J Neurosci*. 33:12337–12351.